

**Einschlußimmobilisierung von Nitrifikanten in
Polycarbamoylsulfonathydrogel und
Adsorptionsimmobilisierung von Nitritoxidierern auf
porösen Silikonträgern: Entwicklung, Optimierung und
mathematische Modellierung**

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig**

**zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

genehmigte

Dissertation

**Von
Andreas Bettin
aus Minden/Westfalen**

1. Referent: Prof. Dr. K.-D. Vorlop
2. Referentin: Prof. Dr. C. Müller-Goymann
eingereicht am: 25.9.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am: 29.1.2001
2001
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Muscat A, Bettin A, Vorlop K-D. Herstellung und Charakterisierung hochporöser und elastischer Silicon-Trägermaterialien mit einer verbesserten Sauerstoffversorgung für immobilisierte Zellen. Chemie Ingenieur Technik. 1996; 68: 584-586.

Bettin A, Muscat A, Vorlop K-D. Development and characterisation of a new highly elastic carrier for immobilization with improved oxygen transport quality. Potsdam: Proceedings of the International Workshop Bioencapsulation V „From fundamentals to industrial applications“, (Hrsg.: Poncelet, D., Dautzenberg, H.); 1996: 225-228.

Jekel M, Bettin A, Willke B, Vorlop K-D. PCS-Hydrogels for the immobilization of viable cells-preparation and biological characterisation. Potsdam: Proceedings of the International Workshop Bioencapsulation V, (Hrsg.: Poncelet, D., Dautzenberg, H.); 1996: 79-84.

Tagungsbeiträge

Bettin A, Kies U, Sommer K, Wethmar M. Bioproduktion und Schadstoffabbau in einem Dreiphasen-Wirbelschicht-Bioreaktor: Modellbildung. Kurzfassung DECHEMA-Jahrestagung. 1996; Bd. 1: 326-328.

Bettin A, Kies U, Sommer K, Wethmar M. Bioproduktion und Schadstoffabbau in einem Dreiphasen-Wirbelschicht-Bioreaktor: Immobilisate zur Herstellung von Dihydroxyaceton. Kurzfassung DECHEMA-Jahrestagung. 1996; Bd. 1: 329-330.

Bettin A, Muscat A, Vorlop K-D. Bioproduktion und Schadstoffabbau in einem Dreiphasen-Wirbelschicht-Bioreaktor: Entwicklung und Charakterisierung eines neuen hochelastischen Trägers für die Immobilisierung mit verbesserten Sauerstofftransporteigenschaften. Kurzfassung DECHEMA-Jahrestagung. 1996; Bd. 1: 331-332.

Bettin A, Hansen J, Breford J, Vorlop K-D. Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung poröser und hochelastischer Träger mit verbesserten Sauerstoffeigenschaften. Kurzfassung DECHEMA-Jahrestagung. 1997.

Bettin C, Hansen J, Breford J, Vorlop K-D. Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung poröser und hochelastischer Träger für die Biokonversion nachwachsender Rohstoffe in aeroben Prozessen. Detmold: 1. Workshop Biokonversion nachwachsender Rohstoffe; 1997: 41.

Bettin A, Hansen J, Breford J, Vorlop K-D. Development of a new method for the production of porous silicone carrier with improved oxygen transfer properties. Barcelona: Proceedings of the International Workshop Bioencapsulation VI; 1997: Poster 7.

<u>1.</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1.	NITRIFIKATION	1
1.2.	IMMOBILISIERUNG.....	3
1.2.1.	EINSCHLUßIMMOBILISIERUNG	3
1.2.2.	ADSORPTIONSIMMOBILISIERUNG	4
1.3.	MATHEMATISCHE MODELLIERUNG	6
<u>2.</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>7</u>
2.1.	BIOMASSEBEREITSTELLUNG	7
2.1.1.	HERKUNFT DER BIOMASSE.....	7
2.1.2.	BIOMASSEANZUCHT UND MEDIENZUSAMMENSETZUNG	7
2.1.3.	AUFKONZENTRIERUNG DER BIOMASSE	8
2.2.	ANALYTIK DER KULTURFLÜSSIGKEIT	9
2.2.1.	PROBENVORBEREITUNG	9
2.2.2.	AMMONIUMANALYTIK	9
2.2.3.	NITRIT- UND NITRATANALYTIK	9
2.3.	IMMOBILISIERUNG.....	10
2.3.1.	EINSCHLUßIMMOBILISIERUNG IN POLYCARBAMOYLSULFONAT-HYDROGELE	10
2.3.1.1.	Synthese von Polycarbamoylsulfonat (PCS)	10
2.3.1.2.	Gelbildung.....	11
2.3.1.3.	Aktivitätstest	12
2.3.2.	ADSORPTIONSIMMOBILISIERUNG AUF PORÖSE TRÄGER	12
2.3.2.1.	Herstellung der Silikonträger nach dem Strangschneideverfahren	12
2.3.2.2.	Herstellung poröser Silikonträger nach dem Emulsionsverfahren.....	16
2.3.2.3.	Freisetzung des Kochsalzes.....	16
2.3.2.4.	Versuche zur Adsorptionsimmobilisierung.....	16
2.3.2.5.	Aktivitätstest	16
2.4.	MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER IMMOBILISATE	17
2.4.1.	LICHTMIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG.....	17
2.4.2.	RASTERELEKTRONENMIKROSKOPISCHE CHARAKTERISIERUNG	17
2.5.	DIFFUSIONSMESSUNG	18
2.5.1.	DIFFUSION NICHT GASFÖRMIGER SUBSTANZEN DURCH POLYCARBAMOYLSULFONAT (PCS) -HYDROGEL.....	18
2.5.2.	DIFFUSION VON SAUERSTOFF DURCH SILIKONMEMBRANEN	18
2.6.	MECHANISCHE CHARAKTERISIERUNG	18
2.7.	VISKOSITÄTSMESSUNGEN.....	19
2.8.	KONTAKTWINKELMESSUNG	19
2.9.	MAHLEN UND SIEBEN	19

<u>3.</u>	<u>POLYCARBAMOYLSULFONAT-HYDROGELE (PCS).....</u>	<u>20</u>
3.1.	FORMGEBUNG.....	20
3.2.	IMMOBILISIERUNG VON AUTOTROPHEN NITRIFIKANTEN IN PCS	23
3.2.1.	IMMOBILISIERUNG IN PCS OHNE ZUSCHLAGSSTOFFE	24
3.2.2.	UNTERSUCHUNG GEEIGNETER ZUSCHLAGSTOFFE ZUR VERBESSERUNG DER ÜBERLEBENSRATE	26
3.2.3.	VERSUCHE MIT HYDRODARCO C.....	29
3.2.3.1.	Variation der Menge	29
3.2.3.2.	Einfluß der Biomasse	31
3.2.3.3.	Einfluß des Substrates	35
3.2.3.4.	Einfluß der Gelmatrix	35
3.2.4.	VERRINGERUNG DER MENGE TOXISCHER STOFFE	43
3.3.	MECHANISCHE UND PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG	47
3.3.1.	MECHANISCHE STABILITÄT DER HYDROGELE.....	47
3.3.2.	VISKOSE EIGENSCHAFTEN DER PCS-HYDROSOLE	49
3.3.3.	BESTIMMUNG VON DIFFUSIONSKOEFFIZIENTEN IN PCS-HYDROGELEN	50
3.4.	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	52
 <u>4.</u>	 <u>PORÖSE ADSORPTIONSTRÄGER AUF BASIS VON SILIKONKAUTSCHUK</u> <u>.....</u>	 <u>53</u>
4.1.	ENTWICKLUNG EINES VERFAHRENS ZUR HERSTELLUNG PORÖSER SILIKON-ADSORBER	54
4.2.	IMMOBILISIERUNG VON NITRIFIKANTEN.....	57
4.3.	MECHANISCHE UND PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG	66
4.3.1.	MECHANISCHE STABILITÄT VON SILIKONFORMKÖRPERN	66
4.3.2.	RHEOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN DER SILIKON/SALZMISCHUNGEN	66
4.3.3.	OBERFLÄCHENEIGENSCHAFTEN VON SILIKONFORMKÖRPERN	67
4.3.4.	BESTIMMUNG DER DIFFUSIONSEIGENSCHAFTEN	68
4.4.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	70
 <u>5.</u>	 <u>MATHEMATISCHE MODELLIERUNG AUTOTROPHER NITRITOXIDIERER</u>	 <u>71</u>
5.1.	MODELLIERUNG FREIKULTIVierter NITRITOXIDIERER IM KONTINUIERLICHEN REAKTOR	72
5.2.	MODELLIERUNG IMMOBILISierter NITRITOXIDIERER IM KONTINUIERLICHEN REAKTOR	76
5.3.	SENSITIVITÄTSANALYSE.....	87

<u>6.</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</u>	<u>90</u>
<u>7.</u>	<u>ANHANG.....</u>	<u>91</u>
7.1.	GERÄTE.....	91
7.2.	CHEMIKALIEN.....	93
7.3.	ABKÜRZUNGEN	94
7.4.	FORMELZEICHEN.....	94
7.5.	INDICES	95
<u>8.</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>96</u>
<u>9.</u>	<u>STEUERDATEI UND PROGRAMMLISTING.....</u>	<u>103</u>
9.1.	STEUERDATEI.....	104
9.2.	PROGRAMMLISTING	106

1. Einleitung

1.1. Nitrifikation

Ammonium ist das Ergebnis des Abbaus biologisch (z.B. in Form von Proteinen) gebundenen Stickstoffs. Außerdem fällt es als Abfallprodukt in verschiedensten Industriezweigen an. So weisen die noch nicht gereinigten Abwässer von Kokereien, Düngemittelherstellern und Erdölraffinerien Konzentrationen bis zu mehreren tausend Milligramm dieser Substanz je Liter auf [1]. Da Ammonium eine hohe Toxizität für Fische besitzt, wird ein Abwassergrenzwert von 5 mg Ammonium/l genannt [2]. Die Toxizität entsteht vor allem durch das Ammoniak, dessen Gleichgewicht mit dem Ammonium-Ion vom pH-Wert abhängig ist. Neben dem toxischen Effekt führt Ammonium in Gewässern zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf.

Die Nitrifikation ist die biologische Oxidation von Ammonium zu Nitrat. Sie wird von verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt. Man unterscheidet dabei zwischen der heterotrophen und der autotrophen Nitrifikation [3]. Die autotrophe Nitrifikation wird von einer Gruppe von Mikroorganismen durchgeführt, die dadurch die für ihren Stoffwechsel notwendige Energie gewinnt. Diese Bakterien werden in der Familie der Nitrobacteriaceae zusammengefaßt. Die Nitrifikation läuft in zwei Teilschritten ab. Im ersten Schritt wird Ammonium zu Nitrit oxidiert. Im zweiten Schritt wird Nitrit zu Nitrat umgesetzt. Die beiden Oxidationen werden von verschiedenen Mikroorganismen durchgeführt.

Die Ammoniumoxidierer sind durch die Vorsilbe Nitroso- gekennzeichnet. Ihr häufigster Vertreter ist das polarbegeißelte Stäbchenbakterium *Nitrosomonas europaea*. Seine Größe beträgt etwa 1-1.5 µm.

Bei den Nitritoxidierern (Vorsilbe Nitro-) ist *Nitrobacter winogradskyi* der bekannteste Vertreter. Er ist etwa 1 µm groß und weist Pleomorphie auf. Zu den Erscheinungsformen gehören Kurzstäbchen, kokkoide oder birnenförmige Zellen. *N. winogradskyi* vermehrt sich sowohl durch Knospung als auch durch Querteilung [4].

Die Ammoniumoxidation verläuft insgesamt betrachtet nach folgender Gleichung:

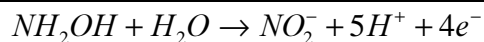
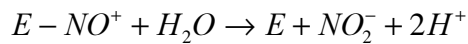
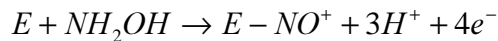


Die Reaktion besteht aus mehreren Schritten, die durch verschiedene Enzyme katalysiert werden. Zuerst wird Ammonium von der Ammoniummonooxygenase (AMO) zu Hydroxylamin oxidiert. Bei dieser endergonischen Reaktion werden zwei Reduktionsäquivalente benötigt, um den molekularen Sauerstoff zu reduzieren.



Die AMO besitzt im aktiven Zentrum Kupfer und reagiert sehr empfindlich gegenüber Komplexbildnern [5].

Im zweiten Schritt wird Hydroxylamin von der Hydroxylaminooxidoreductase (HAO) zu Nitrit oxidiert. Dieser Schritt ist exergonisch.

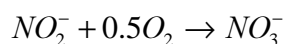


(Gl. 1-3)

Als Zwischenprodukte treten Hydroxylamin und NOH auf [3]. Dabei konnte bisher nur das Hydroxylamin nachgewiesen werden. Das postulierte NOH ist sehr instabil, so daß es vermutlich fest am Enzym gebunden bleibt [6].

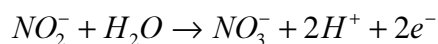
Je Molekül Hydroxylamin wird ein Molekül ATP gebildet. Protonendelokalisationen während der Reaktion schaffen einen Protonengradienten an der Cytoplasmamembran. Von den vier freiwerdenden Elektronen werden zwei für den oben genannten ersten Oxidationsschritt benötigt, die beiden anderen werden für die Reduktion von NAD^+ und O_2 herangezogen. Da das Redoxpotential von NO_2^- / NH_2OH mit +66 mV zu niedrig ist, um $NADH + H^+$ direkt zu bilden, erfolgt ein sogenannter reverser Elektronenfluß. Mit Hilfe des Protonengradienten an der Cytoplasmamembran werden die Elektronen schrittweise auf das Potential von $NAD / NADH + H^+$ angehoben.

Der zweite Teil der Nitrifikation beinhaltet die Oxidation von Nitrit zu Nitrat.



(Gl. 1-4)

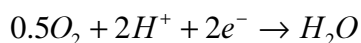
Das eingefügte Sauerstoffatom stammt nicht aus dem molekularen Sauerstoff, sondern wird dem Wasser entnommen.



(Gl. 1-5)

Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, ist die Nitritoxidoreduktase.

Der molekulare Sauerstoff wird durch ein Cytochrom a reduziert.



(Gl. 1-6)

Das Redoxpotential von NO_3^- / NO_2^- ist mit +420 mV zu niedrig, um NAD^+ direkt zu reduzieren. Auch hier wird eine Verlagerung von Protonen während der Oxidation ausgenutzt, um das Potential der Elektronen anzuheben [7].

Bisherige Ergebnisse lassen darauf schließen, daß es sich bei den Substraten der beiden Oxidationsschritte um Ammoniak anstelle von Ammonium bzw. um salpetrige Säure anstelle von Nitrit handelt [8].

Ein Großteil der Energie wird von den beteiligten Bakteriengruppen zur Fixierung von Kohlendioxid im Calvin-Bassham-Zyklus verwendet. Dabei werden insgesamt betrachtet 6 Moleküle CO_2 durch 12 Moleküle $NAD(P)H_2$ und dem Energieeinsatz von 18 Molekülen ATP zu Fructose-6-Phosphat reduziert.

Zur Fixierung von 1 mol CO_2 müssen 35 mol Ammoniak oder 100 mol Nitrit oxidiert werden [7]. Die daraus resultierenden Wachstumsraten sind relativ niedrig und betragen nur einen

Bruchteil der Raten anderer heterotroph wachsender Bakterien. Prosser [9] gibt an, daß die höchste berichtete maximale Wachstumsrate von *N. europaea* bei $0,087 \text{ h}^{-1}$ liegt.

Die biotechnologische Bedeutung der Nitrifikation liegt in der Eliminierung von Ammonium aus Abwässern der Kommunen, der Landwirtschaft und der Industrie. In Abwasserbehandlungsanlagen weichen die Milieubedingungen von den optimalen Bedingungen ab, was zur Folge hat, daß die Wachstumsrate unterhalb der von Prosser genannten Zahl liegt. So beträgt sie bei 10°C nur ca. ein Drittel des optimalen Wertes von 30°C [10]. Weitere Einflußfaktoren sind der pH-Wert [11], der Anteil organischer Substrate [12] sowie die Salzbeladung des Abwassers [13].

1.2. Immobilisierung

Erhöht man die Durchflußrate in einem kontinuierlichen Reaktor über die Wachstumsgeschwindigkeit frei suspendierter Zellen, werden Mikroorganismen vollständig aus dem Reaktor ausgespült [14]. Um dieses Problem zu lösen, muß das Wachstum von der technischen Verweilzeit abgekoppelt werden. Dieses geschieht am besten durch Immobilisierung der Mikroorganismen.

Dabei ist zwischen verschiedenen Arten der Immobilisierung zu unterscheiden. Die bedeutendsten Formen, die auch technisch genutzt werden, sind die Einschlußimmobilisierung und die Adsorptionsimmobilisierung. Beide Methoden werden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Eine weitere Form der Immobilisierung von Mikroorganismen, auf die an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen werden soll, ist die Quervernetzung ganzer Zellen [15].

1.2.1. Einschlußimmobilisierung

Unter Einschlußimmobilisierung versteht man die Immobilisierung von Mikroorganismen und Enzymen in polymeren Netzwerken. Bei diesen Netzwerken handelt es sich zumeist um Hydrogele, die aus einem geringen Polymeranteil und einem Großteil Wasser bestehen. Abbildung 1-1 zeigt eine Auswahl von Polymeren, die als Basis für die Einschlußimmobilisierung dienen.

Viele Arbeiten auf dem Gebiet der Einschlußimmobilisierung von Nitrifikanten wurden bisher mit Carrageenan und Alginat durchgeführt [17], [18], [19], [20], [21]. Heterotrophe Bakterien können nicht in diese Gele eindringen, die Nitrifikanten werden nicht überwachsen. Die Gelperlen werden durch Siebgitter auf einfache Weise zurückgehalten. Die Nachteile der beiden Materialien liegen in der geringen mechanischen Stabilität, dem Bedarf an Kalium- und Calcium-Ionen sowie der relativ leichten biologischen Abbaubarkeit.

Um stabilere Hydrogele zu erhalten, können anstelle von ionischen Wechselwirkungen Wasserstoffbrückenbindungen wie beim Polyvinylalkohol oder kovalente Bindungen die Netzwerkstruktur stabilisieren. Aus der Polymerchemie sind verschiedenste Monomere bekannt, die in wäßriger Phase zu Hydrogelen polymerisieren. Diese Hydrogele sind mechanisch sehr stabil und können unter physiologischen Bedingungen nicht aufgelöst werden. Der Nachteil der Hydrogelbildung besteht in dem großen toxischen Effekt für die eingeschlossenen Mikroorganismen [22].

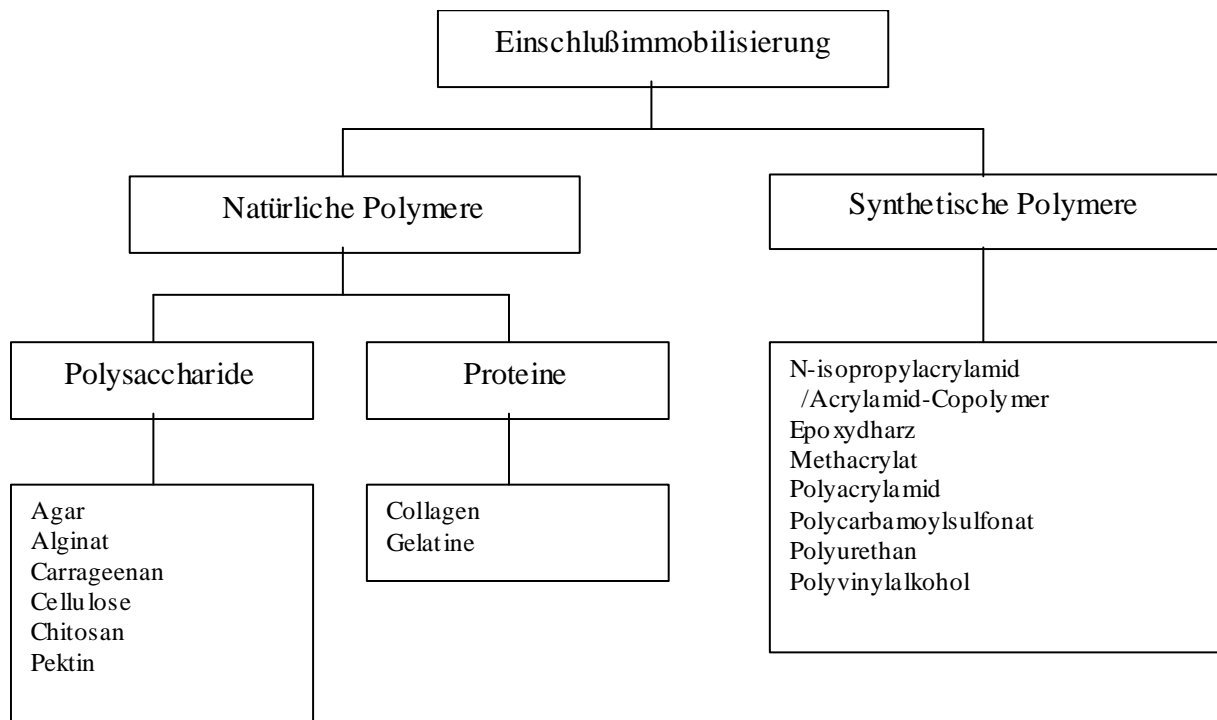


Abbildung 1-1 Materialien für die Einschlußimmobilisierung in Hydrogele [16]

Zu diesen Polymeren gehören die Polyurethane, deren mechanische Stabilität wesentlich besser ist als die natürlicher Hydrogele. Doch zeigt sich, daß bei Immobilisierungen von Nitrifikanten in Polyurethan-Hydrogelen große Aktivitätsverluste in Kauf genommen werden müssen. Dies liegt vor allem an der großen Toxizität der Isocyanat-Gruppen [23].

Es gelang der AG Vorlop jedoch den toxischen Effekt zu verringern indem die Isocyanat-Gruppen eines Polyurethan-Präpolymers im sauren Milieu durch Hydrogensulfitreste verkappt wurden. Dieses neue Produkt mit der Bezeichnung Polycarbamoylsulfonat (PCS) eignet sich besser für die Immobilisierung von Mikroorganismen. Die mechanische Stabilität von PCS-Hydrogelen ist besser als die ionotroper Hydrogele [24], [25], [26], [27].

Polyether-Polyurethane haben zudem den Vorteil, daß sie schwer biologisch abbaubar sind, so daß sie weder von den eingeschlossenen noch von im Medium vorhandenen Mikroorganismen abgebaut werden können [28]. Polyurethane können jedoch chemisch wieder recycelt werden [29]. Problematisch für die Verwendung von PCS für die Immobilisierung von autotrophen Nitrifikanten ist jedoch die noch sehr starke Schädigung der Ammoniakoxidierer, die den Immobilisierungsvorgang kaum überleben. Ziel dieser Arbeit für den Bereich der Einschlußimmobilisierung ist die Optimierung des Einschlußverfahrens für die gesamte Gruppe der autotrophen Nitrifikanten.

1.2.2. Adsorptionsimmobilisierung

Die Adsorption ist eine Selbständige Besiedlung von Mikroorganismen an Oberflächen. Dieser natürliche Vorgang wird unterschieden in einen passiven und einen aktiven Part.

Die passive Form der Immobilisierung beinhaltet die Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismus und Oberfläche. Wechselwirkungen bestehen z.B. in Form von ionischen Bindungen oder Wasserstoffbrückenbindungen. Der aktive Vorgang der Adsorptionsimmobilisierung besteht in der Produktion und Ausscheidung von Makromolekülen, bevorzugt Exopolysaccharide. Diese Exopolysaccharide entsprechen einer Hydrogelmatrix, die die Haftung zwischen Mikroorganismus und Oberfläche sowie die Haftung zwischen benachbarten Mikroorganismen verstärkt [30].

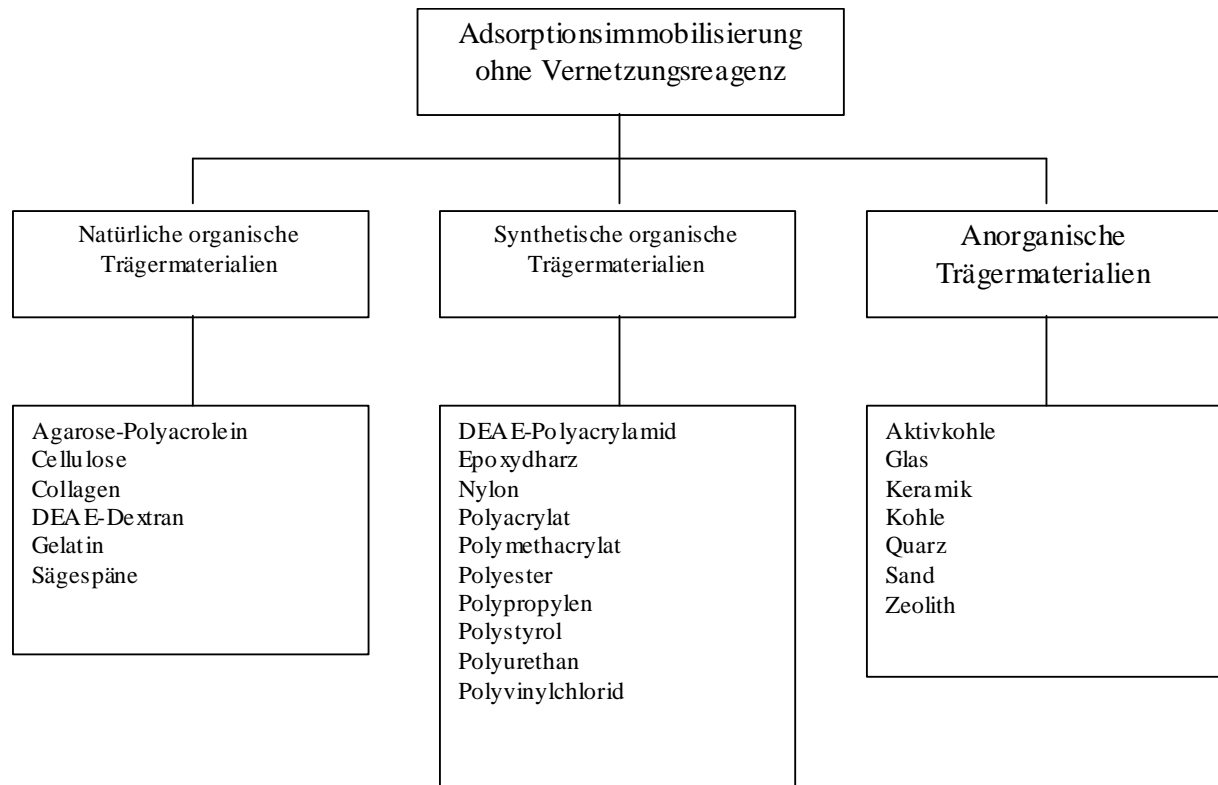


Abbildung 1-2 Trägermaterialien für die Adsorptionsimmobilisierung [16]

Die in Abbildung 1-2 dargestellten Materialien besitzen poröse und unporöse Oberflächen. Die Substratversorgung, insbesondere die Sauerstoffversorgung bei aeroben Prozessen erfolgt durch die wäßrige Phase. Bei unporösen Trägern erfolgt der Sauerstofffluß durch den das Immobilisat umgebenden Grenzfilm. Dem geringen Transportwiderstand stehen jedoch die schlechte Ausnutzung des Trägers sowie der erhöhte Abrieb gegenüber [31], [32], [33]. Diese Faktoren sind bei porösen Trägern umgekehrt ausgeprägt. Der Träger wird durch die Poren auch in tieferen Schichten besiedelt, dort wirken keine oder kaum Scherkräfte. Die Versorgung mit Sauerstoff erfolgt auf rein diffusivem Weg. Da Sauerstoff jedoch eine geringe Löslichkeit in Wasser besitzt, ist der Fluß limitiert. Ein Beispiel hierfür ist poröses Glas [34], [35].

Abhilfe schaffen Materialien die eine hohe Durchlässigkeit für Sauerstoff besitzen, wie zum Beispiel Silikonkautschuk. Silikonkautschuk kann als Adsorptionsträger für Mikroorganismen und tierischen Zellen eingesetzt werden [36]. Auf solchen Vollkugeln können Zellen aber nur

oberflächlich aufwachsen. Die besonderen Sauerstofftransporteigenschaften kommen hierbei nicht zum Tragen.

Verwendet man Silikon als trennende Membran, können zum Beispiel Nitrifikanten auf der einen Seite mit der wäßrigen Phase in Kontakt gebracht werden, die Versorgung mit Sauerstoff erfolgt für die Bakterien von der Rückseite [37].

Von Nachteil ist die Verwendung spezieller Reaktoren für diese Art der Immobilisierung. Einfacher ist die Verwendung der von Muscat und Vorlop entwickelten porösen Träger aus Silikonkautschuk, die in jedem herkömmlichen Reaktortyp eingesetzt werden können [38].

Diese Träger weisen jedoch eine geringe Dichtedifferenz zum Medium auf. Zudem ist das Herstellungsverfahren nicht für einen technischen Einsatz geeignet. Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung poröser Träger auf Basis von Silikon für den Einsatz in einem biotechnologischen Prozeß, sowie die Entwicklung eines Herstellungsverfahrens, um Träger gleichbleibender Qualität im technischen Maßstab herstellen zu können.

1.3. Mathematische Modellierung

Die Prozeßsteuerung und die Prozeßoptimierung sind wesentliche Probleme der industriellen Nutzung von biotechnologischen Verfahren. Probleme bereitet die Prozeßsteuerung deshalb, weil häufig eine on-line Meßwerterfassung für viele Parameter nur schwierig zu gewährleisten ist. Die Optimierung erfolgt zumeist nach dem "trial and error" Prinzip und bedeutet einen erheblichen Kosten- und Zeitaufwand. Eine Verbesserung der Situation kann durch eine mathematische Modellbildung für Kultivierungen erreicht werden. Der Vorteil eines mathematischen Modells liegt darin, daß es den Wachstumsprozeß und die Produktbildung der Mikroorganismen in komprimierter Form beschreibt. Anhand mathematischer Modelle kann man, sofern sie die Realität sehr gut abbilden, Optimierungen vornehmen und den Prozeß regeln [39].

Es existieren in der Literatur verschiedene mathematische Modelle, die die Bildung von Biofilmen durch Adsorption und Desorption beschreiben [40] bis [47]. Die Besiedlung eines porösen Trägers entspricht in der äußersten Trägerschicht der Bildung eines Biofilms. Bakterien des Mediums haften sich an einen Träger (Adsorption) oder werden von der Oberfläche des Trägers abgeschert (Desorption). In tieferen Schichten können sich die Mikroorganismen durch Diffusion, Wachstum und aktive Bewegung im Träger verbreiten. Die einzelnen Formen der Bewegung lassen sich nur schwierig unterscheiden, daher bietet es sich an Modelle aufzustellen, die diesen Vorgang als eine gemeinsame Funktion darstellen [48], [49]. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein dynamisches mathematisches Modell für auf optimierten porösen Silikonadsorbern adsorbierte Nitritoxidierer erstellt werden. Ziel ist die Verknüpfung der beiden Modellvorstellungen zu einem einfachen Modell, daß die Kultivierung von Bakterien auf porösen Trägern mathematisch beschreibt.

2. Material und Methoden

Eine ausführliche Liste der zu den hier beschriebenen Methoden verwendeten Geräte und Chemikalien ist im Anhang in Kapitel 7 zu finden.

2.1. Biomassebereitstellung

2.1.1. Herkunft der Biomasse

Bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen handelt es sich um eine Mischkultur autotropher Nitrifikanten. Diese Mischkultur wurde von Th. Willke aus Belebtschlämmen von Kläranlagen angereichert [50]

2.1.2. Biomasseanzucht und Medienzusammensetzung

Die Anzucht von Biomasse erfolgte ebenso wie die diskontinuierlichen Versuche mit adsorptionsimmobilisierten Bakterien in 300 ml-Schüttelkolben mit drei Schikanen. Die Kolben enthielten ca. 100 ml Medium, wenn Biomasse gewonnen werden sollte und 50 ml, wenn adsorptionsimmobilisierte Nitritoxidierer getestet werden sollten. Für Aktivitätstest von in Hydrogel eingeschlossenen Nitrifikanten wurden 100 ml-Schüttelkolben ohne Schikanen verwendet, die 50 ml Medium enthielten. Die Ammonium- und/oder Nitrit-Startkonzentration entsprach 10 mM bei allen Immobilisaten.

Nitritoxidierer wurden aus der Mischkultur autotropher Nitrifikanten dadurch gewonnen, daß eine Kultur mehrere wochenlang nur mit Nitrit versorgt wurde. Durch Überführung von 10 % Inoculum in einen jeweils frischen Kolben wurden die Ammoniakoxidierer ausgedünnt.

Die mit Aluminiumkappen verschlossenen Kulturkolben wurden vor dem Gebrauch bei 121°C und einem Druck von 2000 HPa autoklaviert. Die Mediumsbestandteile Lösung A und Lösung B wurden getrennt autoklaviert und nach Abkühlung vereinigt. Die Spurenelementelösung und der pH-Indikator Phenolrot wurden durch Sterilfiltration dem Medium zugegeben (Tabelle 2-1 und Tabelle 2-2).

Die Kultivierung der freien und immobilisierten Nitrifikanten erfolgte in einem Schüttelschrank bei 30°C und einer Schüttelfrequenz von 120 min⁻¹.

Tabelle 2-1 Medienzusammensetzung für autotrophe Nitrifikanten nach Willke [50]

Lösung A	Konzentration
K ₂ HPO ₄	27,87 g/l
KH ₂ PO ₄	5,44 g/l
NaHCO ₃	0,5 g/l
Lösung B	
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,05 g/l
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,01 g/l
Weitere Bestandteile	
Spurenelementlösung	2 ml/l
Phenolrot (Indikator)	2 ml/l

Tabelle 2-2 Spurenelementlösung für autotrophe Nitrifikanten nach Willke [50]

Substanz	Konzentration
Deionisiertes Wasser	1000 ml
Na ₂ -EDTA	2,5 g/l
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1,5 g/l
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	1,0 g/l
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,3 g/l
MnCl ₂ * 2 H ₂ O	0,3 g/l
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g/l
H ₃ BO ₃	0,3 g/l
HCl (37%)	1,0 ml/l

Die Substrate Ammonium (NH₄) und Nitrit (NO₂) wurden ebenso wie die Carbonatzugabe je nach Versuchsbedingungen der Kulturlösung hinzugefügt.

2.1.3. Aufkonzentrierung der Biomasse

Für die Immobilisierung von Biomasse wird Kulturbrühe autotropher Nitrifikanten 20 Minuten lang bei 15000 x g und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit aufgenommen.

2.2. Analytik der Kulturflüssigkeit

2.2.1. Probenvorbereitung

Zur Bestimmung von Edukten und Produkten wurden jeweils 100 µL Probe entnommen und mit 900 µL 5% Vol. Methanollösung in Wasser verdünnt. Der Methanolgehalt entsprach dem des Fließmittels der Anionenanalytik und stoppte gleichzeitig die biologische Reaktion ab. Die Probe wurde anschließend bei 14000 U/min 5 min zentrifugiert. Mit einer verstellbaren Eppendorfpipette wurden 900 µL des Überstandes vorsichtig aufgenommen und in ein Probenvial überführt.

2.2.2. Ammoniumanalytik

Der Ammoniumgehalt der Proben wurde mit Hilfe einer Fließinjektionsanalyse (FIA) bestimmt. Bei dieser Methode wurde die Probe in ein reaktives Fließmittel injiziert und durch eine mehrere Meter lange Kapillare gepumpt. Ammonium reagiert mit o-Phtaldialdehyd in Anwesenheit von 2-Mercaptoethanol zu einem Produkt, das mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 420 nm detektiert werden kann [51]. Die Zusammensetzung des Fließmittels ist in Tabelle 2-3 aufgeführt.

Tabelle 2-3 Zusammensetzung des Fließmittels für die Ammoniakanalyse mit der FIA

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	27,22 g
K ₂ HPO ₄	34,84 g
Phtaldialdehyd	2,683 g
Mercaptoethanol	0,313 g
Deionisiertes H ₂ O	Ad 2 Liter

Nach dem Ansetzen wurde das Laufmittel 24 h im Hellen gerührt.

2.2.3. Nitrit- und Nitratanalytik

Die Nitrit- und Nitratanalytik erfolgte mittels einer HPLC (high performance liquid chromatographie). Die Trennung der beiden Ionen erfolgte in einer Trennsäule aus ODS-Hypersil mit einer Partikelgröße von 3 µm. Die Vorsäule enthielt gröberes Material mit einem Partikeldurchmesser von 30 µm. Sie diente ausschließlich dazu, Verunreinigungen wie z.B. biologisches Material von der Säule fernzuhalten. Die Packung der Vorsäule mußte regelmäßig erneuert werden, um eine Kontamination der Hauptsäule zu verhindern.

Das Elutionsmittel war ein Gemisch aus 1900 ml deion. Wasser, 100 ml Methanol und 4 ml Octylamin. Mit Hilfe von Phosphorsäure erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf 6,5. Zur Detektion von Nitrit und Nitrat wurde ultraviolettes Licht der Wellenlänge 210 nm verwendet (Tabelle 2-4 und Tabelle 2-5).

Tabelle 2-4 Trennungsbedingungen für die Nitrit- und Nitratanalytik

Detektor	UV 210 nm
Flußrate	2,05 ml/min
Stationäre Phase	ODS-Hypersil 3 µm
Temperatur	Raumtemperatur
Auswertung	LC10
Meßzelle	2 mm

Tabelle 2-5 Laufmittel für die Nitrit- und Nitratanalytik

Deion. Wasser	1900 ml
Methanol	100 ml
Octylamin	4 ml
Phosphorsäure	Bis pH 6,5

2.3. Immobilisierung

Generell wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Wege der Immobilisierung bestritten. Die Einschlußimmobilisierung in Polycarbamoylsulfonat-Hydrogele und die Adsorptionsimmobilisierung auf porösen Trägermaterialien.

2.3.1. Einschlußimmobilisierung in Polycarbamoylsulfonat-Hydrogele

2.3.1.1. Synthese von Polycarbamoylsulfonat (PCS)

Polycarbamoylsulfonat (PCS) ist ein Derivat des Polyurethans dessen freien Isocyanatgruppen (NCO-Gruppen) mit Hydrogensulfit blockiert sind. Die Synthese des PCS-Präpolymers erfolgte nach der Methode von Jekel [52]. Die einzelnen PCS Ansätze unterschieden sich in ihrem unterschiedlichen Verhältnis von NCO- zu OH-Gruppen (Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6 NCO:OH-Verhältnis der verwendeten PCS-Typen

PCS-Typ	PCS-2.5	PCS-2.0	PCS-1.8	PCS-1.4
NCO:OH-Verhältnis	2,5:1	2,0:1	1,8:1	1,4:1

Nach der Synthese wurde das PCS-Präpolymer bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.3.1.2. Gelbildung

Die Gelbildung durch Polyurethane (PUR) mit Wasser erfolgt spontan innerhalb weniger Sekunden. Damit PCS mit Wasser ein Gel bildet, muß die Hydrogensulfitgruppe, die bei der Synthese als Schutz der Isocyanat-Gruppe eingeführt wurde, wieder abgespalten werden. Die Abspaltung erfolgt bei Raumtemperatur durch Erhöhung des pH-Wertes. Das Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit wird bei ca. pH 8 erreicht [24].

Herstellung der Gele nach standardisiertem Verfahren (siehe auch Tabelle 2-8)

Zur Herstellung der Hydrogele wurde das gefrorene PCS-Hydrosol aufgetaut und mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt (siehe Tabelle 2-7). Zuschlagstoffe wurden, soweit eingesetzt, zur Suspension gegeben und mit dieser über einen definierten Zeitraum inkubiert. Dabei wurde der pH-Wert je nach Versuchsreihe durch konzentrierte Salzsäure abgesenkt und nach Abschluß der Inkubation durch äquimolare Menge Natriumhydroxidlösung wieder angehoben.

Tabelle 2-7 Zusammensetzung eines PCS-Hydrogels soweit nicht anders angegeben

PCS	Additiv	Biomasse (Feuchtmasskonzentrat)
10 %	5 %	1 %

Durch Zugabe von Tri-Natriumphosphat wurde der pH-Wert in einen physiologisch für Mikroorganismen verträglichen Bereich angehoben. Sie wurden dann im folgenden Verfahrensschritt der Lösung in Form aufkonzentrierter Biomasse zugegeben. Die Phosphatlösung wirkte gleichzeitig als Puffer, da sich bei der Abspaltung der Hydrogensulfitgruppen der pH-Wert in den sauren Bereich verschiebt. Die PCS/Biomasselösung (10 g \approx 10 ml) wurde in drei Petrischalen ausgegossen, so daß die Schichtdicke des ausgehärteten PCS-Hydrogels bei unter einem Millimeter lag. Dieses war notwendig, um Stofftransportlimitierungen bei der Ammoniak- und Nitritoxidation zu vermeiden.

Nach einer definierten Zeit (Standard 30 Minuten) wurde das Hydrogel mit einem Skalpell in Quadrate mit einer Kantenlänge von 5 mm zerschnitten und in 100 ml-Schüttelkolben ohne Schikanen überführt. Die Kolben wurden, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, mit Medium befüllt und bei 30°C im Schüttelschrank kultiviert. Einen Überblick über die notwendigen Vorgänge bei der Immobilisierung von Nitrifikanten in PCS-Hydrogele bietet Tabelle 2-8.

Tabelle 2-8 Tabellarische Übersicht über die zur Immobilisierung von Nitrifikanten in PCS-Hydrogel notwendigen Arbeitsschritte

• PCS-Präpolymer auftauen
• PCS mit Additiv (z.B. Aktivkohle) und Wasser versetzen
• pH-Wert zur Inkubation senken (konz. HCl)
• Inkubation (90 Minuten)
• pH-Wertanhebung mit NaOH (äquimolar zur HCl)
• Anhebung des pH-Wertes mit Tri-Natriumphosphat
• Zugabe der Biomasse
• Eventuell weitere pH-Wert-Anhebung
• Ausgießen von Hydrogelplatten
• Zerschneiden der Hydrogele
• Überführung der Hydrogele in Medium für Nitrifikanten

Genauere Angaben erfolgen zu jedem Versuch in Kapitel 3.2 in Form einer Tabelle.

2.3.1.3. Aktivitätstest

Aus den Schüttelkolben wurden mehrmals täglich Proben entnommen und gemäß Kapitel 2.2 analysiert.

2.3.2. Adsorptionsimmobilisierung auf poröse Träger

2.3.2.1. Herstellung der Silikonträger nach dem Strangschneideverfahren

Zur Herstellung poröser Silikonträger nach dem Strangschneideverfahren wurde ein bei Raumtemperatur vernetzender 2-Komponenten Silikonkautschuk (RTV2) mit Kochsalzpartikeln definierter Größe gemischt. Das RTV2-Silikon bestand aus einem Basispolymer (U1) und einem Vernetzer (Silopren U Vernetzer 260), die im Verhältnis 94 : 6 vereinigt wurden. Ein Platinkatalysator (Silopren U Katalysator Pt-L) wurde zu den beiden Komponenten im Verhältnis 1:1000 hinzugesetzt.

Das fließfähige Gemisch wurde nun mit dem Kochsalz vereinigt. Dieses geschah mit einem nichtmetallischen Hilfsmittel, um eine Deaktivierung des Katalysators zu vermeiden.

War es notwendig die Dichte des Trägers zu erhöhen, wurde dem Gemisch pulverförmiges Titandioxid zugesetzt.

Da das Kochsalz später aus dem ausgehärtetem Träger ausgewaschen wurde entsprach der Volumenanteil des eingesetzten Kochsalzes dem zu erwartenden Porenvolumenanteil. Der Anteil des Titandioxids sollte so gewählt werden, daß die Dichte des mit Wasser gefüllten porösen Silikonträgers 1100kg/m^3 beträgt. Daraus ergab sich ein Volumenanteil des Titandioxids am Gesamtgemisch nach folgender Formel:

$$V_{TiO_2} = \frac{\delta_{Träger} - V_{Poren} * 1000 \frac{kg}{m^3} - (1 - V_{Poren}) * 1000 \frac{kg}{m^3}}{3200 \frac{kg}{m^3}} \quad (Gl. 2-1)$$

Basierend darauf ließ sich der Massenanteil des Kochsalzes , des Silikons und des Titandioxids in Abhängigkeit vom Porenvolumen bestimmen:

$$\epsilon_{NaCl} = \frac{V_{Poren} * 2200 \frac{kg}{m^3}}{V_{Poren} * 2200 \frac{kg}{m^3} + V_{TiO_2} * 4200 \frac{kg}{m^3} + (1 - V_{Poren} - V_{TiO_2}) * 1000 \frac{kg}{m^3}} \quad (Gl. 2-2)$$

$$\epsilon_{SI} = \frac{(1 - V_{Poren} - V_{TiO_2}) * 1000 \frac{kg}{m^3}}{V_{Poren} * 2200 \frac{kg}{m^3} + V_{TiO_2} * 4200 \frac{kg}{m^3} + (1 - V_{Poren} - V_{TiO_2}) * 1000 \frac{kg}{m^3}} \quad (Gl. 2-3)$$

$$\epsilon_{TiO_2} = \frac{V_{TiO_2} * 4200 \frac{kg}{m^3}}{V_{Poren} * 2200 \frac{kg}{m^3} + V_{TiO_2} * 4200 \frac{kg}{m^3} + (1 - V_{Poren} - V_{TiO_2}) * 1000 \frac{kg}{m^3}} \quad (Gl. 2-4)$$

Tabelle 2-9 Zusammensetzung der Silikon-Titandioxid-Kochsalzmischung bei verschiedenen Porositäten

Porenvolumen [%]	NaCl [%]	Basispolymer U1 [%]	Silopren U Vernetzer 260 [%]	TiO ₂ [%]	Silopren U Katalysator Pt-L [%]
40	55,70	33,83	2,19	8,31	0,0359
45	60,37	29,73	1,90	8,00	0,0316
50	64,71	25,92	1,65	7,72	0,0275
55	68,75	22,36	1,43	7,46	0,0238
60	72,53	19,04	1,22	7,21	0,0203

Tabelle 2-9 zeigt exemplarisch die Zusammensetzung der Silikon-Kochsalz-Titandioxidmischung zur Herstellung von porösen Silikonträgern mit unterschiedlichen Porenvolumina.

Das Gemisch wurde nun bei Raumtemperatur in die Herstellapparatur gefüllt. Diese bestand aus einem zylinderförmigen Hauptteil, der am unteren Ende konisch zulief. Am Boden befanden sich vier Zweistoffdüsen. Jede Düse hatte zwei Öffnungen. Eine für den Auslaß des Silikon/Salz-Gemisches, die sich im Zentrum der Düse befand und einen Durchmesser von 1,5 mm hatte, sowie eine Öffnung für die Durchführung von Luft, die sich am Kreisrand befand (Abbildung 2-1).

Durch die Öffnung im Zentrum wurde das Silikon/Kochsalzgemisch mit Druck als Vollstrang gefördert. Der Vollstrang wurde nach dem Austritt aus der Förderöffnung von einem rotierenden Draht der Stärke 80 µm geschnitten. Der kontinuierliche Luftstrom wurde benötigt, um ein Verkleben des geschnittenen Silikonpartikels am Draht zu verhindern. Der Partikel wurde zudem vom Luftstrom in einen rotierenden Dragierkessel geleitet, der zu 10 Vol. % mit Kochsalz der Firma Solvay vom Typ extrafein gefüllt war (siehe Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10 Partikelgrößenverteilung von SOLSEL der Firma Solvay

Partikelgröße	Massenanteil [%]
> 630 µm	< 0,3
310-630 µm	0,3-0,5
100-310 µm	75-95
< 100 µm	< 20

Der Dragierkessel wurde durch Heißluft auf 90°C temperiert. Die Silikonpartikel vielen auf das Salz, rundeten sich durch die Rollbewegungen ab und härteten im temperiertem Salz innerhalb von Minuten aus (Abbildung 2-2).

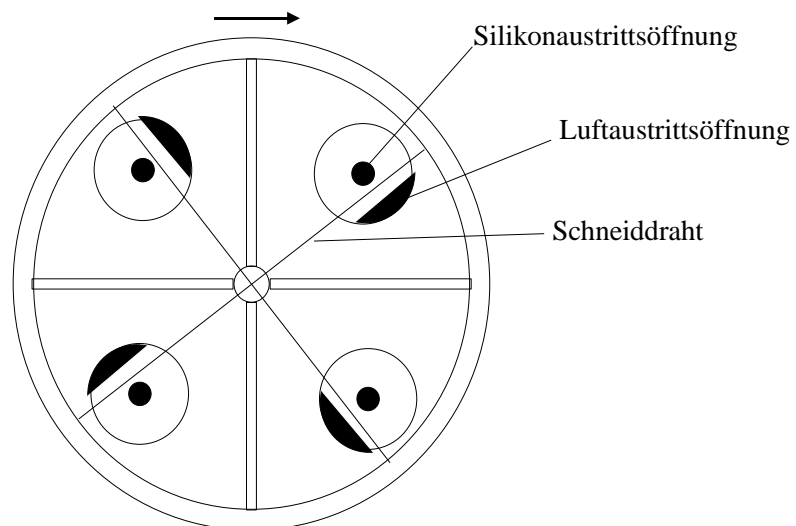


Abbildung 2-1 Skizze des Schneidwerkzeugs

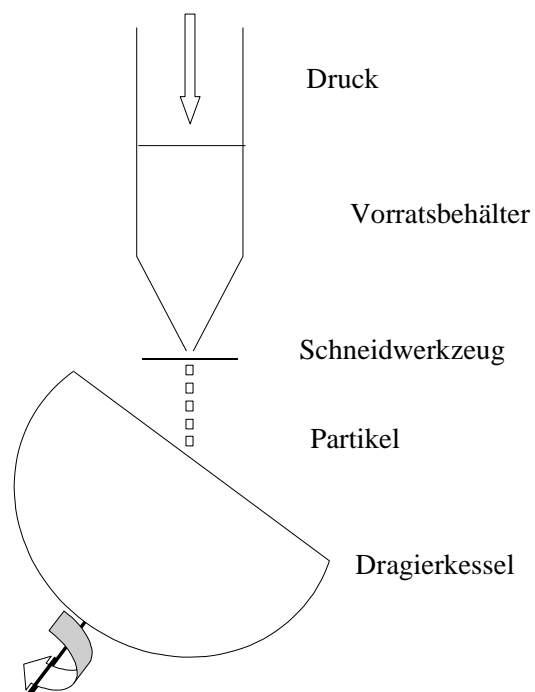


Abbildung 2-2 Skizze der Apparatur zur Herstellung poröser Silikonträger

2.3.2.2. Herstellung poröser Silikonträger nach dem Emulsionsverfahren

Kugelförmige Träger auf Basis von porösem Silikon können nach dem Suspensionsverfahren hergestellt werden. Hierzu wird das Silikon-Kochsalzgemisch in ein gerührtes und bei 70°C temperiertes Glyzerinbad gegeben. Die pastöse Masse zerfällt unter der Einwirkung der Scherkräfte im Reaktor in Einzelpartikel, die sich abrunden und nach wenigen Minuten aushärten. Die Partikel können nun mit Wasser vom Glyzerin und vom Kochsalz befreit werden. Das Porenvolumen erreicht bei diesem Verfahren ca. 70 Vol. % [38]. Ebenso wie beim Strangschneideverfahren kann auch hier Titandioxid als Additiv eingesetzt. Es gelten die gleichen Beziehungen wie in Kapitel 2.3.2.1.

2.3.2.3. Freisetzung des Kochsalzes

Um das Porensystem vom Kochsalz zu befreien, wurden die Silikonträger in deionisiertem Wasser über mehr als 2 Tage gelagert. Das Wasser wurde in einem mindestens 10-fachen Überschuß eingesetzt und mehrmals gewechselt.

2.3.2.4. Versuche zur Adsorptionsimmobilisierung

Zur Vorbereitung der Adsorptionsimmobilisierung wurden Silikonperlen mit Hilfe einer Lochschablone (0,1 mm Größendifferenz) nach Größe getrennt und mit Wasser in den Versuchsgefäßen autoklaviert. Bei den Versuchsgefäßen handelte es sich um 300-ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die durch eine Aluminiumkappe verschlossen wurden.

Da das Silikon schlecht zu benetzen war, wurde dem Wasser eine geringe Menge Tensid (handelsübliches Spülmittel) zugegeben. Nach dem Autoklavieren waren die Silikonträger vollständig mit Wasser benetzt und am Boden sedimentiert. Die Tensidlösung wurde durch kontinuierlichen Austausch der Flüssigkeit aus dem Reaktionsgefäß entfernt.

Anschließend wurde das Wasser durch Medium für Nitrifikanten ersetzt und mit Inoculum beimpft (Kapitel 2.1.2).

2.3.2.5. Aktivitätstest

Um möglichst gleichbleibende Kultivierungsbedingungen zu gewährleisten, wurde das Medium in den Kulturkolben im 24-Stunden-Rhythmus gewechselt und hinsichtlich des Eduktes (Nitrit) und des Produktes (Nitrat) analysiert (Kapitel 2.2). Bei dem Mediumwechsel wurden die Kulturbrühe mit den Trägern durch ein Sieb gegossen, daß nur die Immobilisate zurückhielt.

2.4. Morphologische Untersuchungen der Immobilisate

Die Kulturflüssigkeit der Immobilisate wurde mit den in Kapitel 2.2 genannten Methoden analysiert. Die Immobilisate selbst wurden durch lichtmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen weiter charakterisiert.

2.4.1. Lichtmikroskopische Charakterisierung

Um Mikroorganismen auf Adsorbern im Lichtmikroskop zu beobachten, mußte der Kontrast zwischen Bakterien und Matrix erhöht werden. Mit Hilfe von Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT-Chlorid) können lebende Zellen angefärbt werden. In den Zellen wird das farblose INT-Chlorid durch Oxygenasen in INT-Formazan umgewandelt. Das Produkt weist eine rote Farbe auf [53].

Zur Färbung lebender Mikroorganismen auf Immobilisatträgern wurden zwei bis drei Kugeln für 20 Minuten in 1ml einer 0,2 % INT-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 ml Formaldehyd (37 %) gestoppt. Die Flüssigkeit wurde verworfen, und die Immobilisate konnten für die lichtmikroskopischen Untersuchungen präpariert werden. Mit der Formaldehydlösung waren die Präparate ca. einen Monat lagerbar [54]. Die Oberfläche und der Querschnitt der Perlen wurden mit Hilfe eines Stereomikroskops betrachtet und fotografiert.

2.4.2. Rasterelektronenmikroskopische Charakterisierung

Die porösen Silikonperlen wurden getrocknet (Eksikkator) und mit einer Rasierklinge angeschnitten und aufgerissen. Dadurch wurde vermieden, die Bakterienzellen durch das Schneidwerkzeug über die Schnittfläche zu verteilen.

Nach dem Zerteilen wurden die Objekte mit Leitsilber auf einen metallischen Körper geklebt und mit Gold besputtert. Im Rasterelektronenmikroskop konnten die Perlen untersucht und fotografiert werden.

2.5. Diffusionsmessung

2.5.1. Diffusion nicht gasförmiger Substanzen durch Polycarbamoylsulfonat (PCS) - Hydrogel

Die Diffusionskoeffizienten für verschiedene Moleküle wurden mit Hilfe eines Doppelmantel-Zweikammermeßsystems bestimmt. Zwischen den beiden Kammern konnte die zu vermessende Membran durch Klemmen fixiert werden. Die obere Kammer wurde durch einen senkrecht eingetauchten Balkenrührer durchmischt. In der unteren Kammer befand sich zu diesem Zweck ein Magnetrührkern. Die Substanz wurde nun in die obere Zelle gegeben und dort durch den Blattrührer sofort gleichmäßig verteilt. Die Substanz konnte nun entlang des Konzentrationsgefälles durch die Membran in die untere Meßzelle diffundieren. Eine HPLC-Pumpe sorgte dafür, daß die Flüssigkeit der unteren Zelle kontinuierlich durch einen Detektor (UV oder RI) bewegt wurde. Anhand der so ermittelten Konzentrationsänderung konnte der effektive Diffusionskoeffizient bestimmt werden.

2.5.2. Diffusion von Sauerstoff durch Silikonmembranen

Zur Bestimmung der Permeationskoeffizienten von Sauerstoff durch Silikonmembranen mit und ohne Additiv wurde eine selbsthergestellte Silikonmembran anstelle einer herkömmlichen Membran vor eine Clark-Sauerstoffelektrode gespannt. Die Elektrode befand sich in einem Reaktor, dessen Gasatmosphäre mit Wasserdampf gesättigt und temperiert war. Ein Rührer sorgte dafür, daß die Elektrode ausreichend angeströmt wurde. Über ein Ventil konnte der Reaktor schnell mit Stickstoff oder Luft durchströmt werden. Ausgewertet wurde die Änderung des Stromflusses der Elektrode, wenn Luftsauerstoff durch den vorher sauerstofffreien Reaktor geleitet wurde [38].

2.6. Mechanische Charakterisierung

Die mechanische Charakterisierung von Silikonträgern erfolgte durch Dehnungsversuche nach DIN 53504 sowie in einem abgewandelten Verfahren für PCS-Hydrogele, bei dem quaderförmige Hydrogelkörper miteinander verglichen werden konnten [55].

Die Silikonmembranen wurden am Institut für Baustoffe, Massivbau und Brandschutz der TU-Braunschweig vermessen. Die Silikonformkörper hatten eine Porösität von 50 Vol. % und – sofern eingesetzt – einen Titandioxidanteil von 3,125 Vol. %. Die Silikonmembranen wurden mit Hilfe eines Formkörpers dessen Form in der DIN 53504 beschrieben ist, so gestanzt, daß eine glatte Schnittfläche frei von Rissen entstand. Die Schnittfläche mußte frei von Rissen sein, da bei der Einwirkung von Zugkräften Rißverlängerungen auftreten konnten. PCS-Hydrogele wurden in mehreren Millimetern Stärke gegossen und in quaderförmige Streifen geschnitten.

2.7. Viskositätsmessungen

Viskositätsmessungen von PCS-Lösungen sowie von Silikon/Salzmischungen wurden in einem Rotationsviskosimeter der Firma Haake durchgeführt. Die Vermessung der PCS-Lösungen erfolgte im sauren Bereich, um Meßwertverfälschung durch einsetzende Vernetzungsreaktionen zu verhindern. Die Versuche mit Silikon/Salzmischungen wurde ohne Platinkatalysator durchgeführt, damit es zu keiner Vernetzungsreaktion kommen konnte.

2.8. Kontaktwinkelmessung

Die Kontaktwinkelmessung wurde mit einer Kontaktwinkelmeßapparatur vom Typ G30 mit installierter Rechneinheit und Videosystem der Firma Krüss (Hamburg) an der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) durchgeführt. Es wurde der Kontaktwinkel gemessen, den ein Wassertropfen mit einer Oberfläche bildet. Dazu wurde mit einer Pipette vorsichtig ein Tropfen deionisiertes Wasser auf die Oberfläche einer ebenen porenfreien Silikonkautschukplatte aufgesetzt. Die Platte bestand aus reinem Silikon oder einem Silikon/Titandioxidgemisch. Mit Hilfe der Meßapparatur wurde an zwei gegenüberliegenden Stellen der Winkel zwischen Tropfen und Oberfläche bestimmt.

2.9. Mahlen und Sieben

Für die Herstellung verschiedenporiger Immobilisatträger, wurden unterschiedliche Salzpartikelgrößen benötigt. Das dazu verwendete Speisesalz extrafein (SOLSEL) der Firma Solvay wurde in einer Retsch-Fliehkraftkugelmühle vom Typ S1 auf Stufe 60 gemahlen. Je Mahlgang, der 20 Minuten dauerte, wurden ca. 200 g Salz eingesetzt, die mit Hilfe von drei Keramikugeln zerkleinert wurden.

Anschließend erfolgte eine dreißigminütige Siebung auf einer Retac-3D-Rüttelmaschine. Es wurden Siebe der Maschengröße 100, 200 und 300 µm genutzt, um das gemahlene Salz in verschiedene Fraktionen zu zerlegen.

3. Polycarbamoylsulfonat-Hydrogele (PCS)

Polycarbamoylsulfonat (PCS) ist ein Polyurethanderivat, dessen Isocyanat-Gruppen mit Hydrogensulfit blockiert sind. Polyurethane werden aus einer Isocyanat und einer hydroxylgruppenhaltigen Komponente in einer Additionsreaktion gewonnen [56]. Die in dieser Arbeit verwendeten Polyurethane bestehen aus einem Polyether als Polyolkomponente und Toluoldiisocyanat als Isocyanatkomponente. Polyurethane werden in Form von Präpolymeren gewonnen. Präpolymere sind Oligomere, die im Gegensatz zu Polymeren weitere Polymerisationsschritte eingehen können. Die Bildung von Hydrogelen aus PCS ist in Kapitel 2.3.1.2 beschrieben.

3.1. Formgebung

Polyurethan-Hydrogele entstehen durch Zugabe von Wasser zu Polyurethan-Präpolymeren. Die Reaktion ist jedoch so schnell, daß keine Formgebungsschritte eingeleitet werden können [57]. PCS reagiert mit Wasser abhängig vom pH-Wert in einer mäßig schnellen Reaktion. Es bleibt hierbei Zeit für die Formgebung.

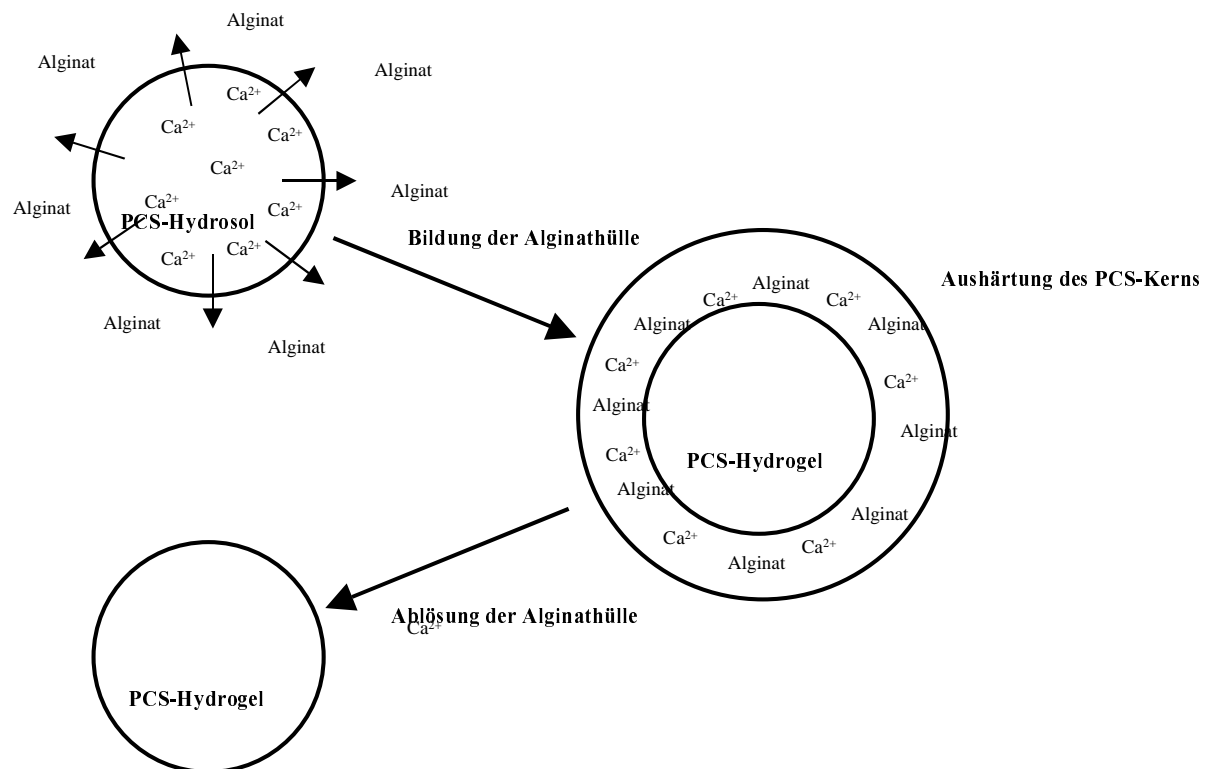


Abbildung 3-1 Formgebung nach dem Ca-Alginat-Verfahren

Die bisher bekannte Möglichkeit der Formgebung besteht in der Zugabe von Ca -Ionen zum PCS-Hydrosol. Das Gemisch wird anschließend mit einer Immobilisierungsapparatur in eine

Natrium-Alginat-Lösung vertropft. Aus dem hochviskosen Tropfen wandern Calcium-Ionen in Richtung des bulk-Mediums (Abbildung 3-1).

An der Kontaktstelle zwischen PCS-Hydrosoltropfen und der Alginatlösung fällt Ca-Alginat aus und bildet eine stabile Hülle um den PCS-Kern. Dieser kann nun innerhalb kurzer Zeit aushärten. Die Alginathülle kann mit Phosphatlösung wieder aufgelöst werden [58].

Eine weitere Möglichkeit der Formgebung soll untersucht werden. Sie besteht in der Ausnutzung von Polyelektrolyt-Polyelektrolyt-Komplexen (PP-Komplexe). PP-Komplexe entstehen aus der Wechselwirkung von Polykationen mit Polyanionen. Wird die wässrige Lösung eines der beiden Ionen in die andere vertropft, kann sich an der Oberfläche des eintauchenden Tropfens eine feste nichtgelöste Schicht bilden, die die Kugelform des Tropfens aufrecht erhält. Das Innere einer solchen Kugel bleibt flüssig [59], [60].

Denkbar ist die Kombination von PCS-Hydrogelerlenherstellung mit der Bildung von PP-Komplexen. Hierbei läuft ein Formgebungsprozeß folgendermaßen ab:

Ein PCS/Polyanion-Gemisch wird in die Vernetzerlösung des Gegenions vertropft. An der Oberfläche des Tropfens wechselwirken Polyanion und –kation, die den Tropfen solange stabilisieren, bis das PCS-Hydrosol aushärten kann. Da die Ketten der Polyionen bis in tiefere Schichten der Kugel reichen, wäre die Oberfläche der Kugel mit dem Kern eng verknüpft. Ein Abtrennen der Oberflächenschicht, wie im Falle der Ca-Alginat-Hülle entfiel (Abbildung 3-2).

Die Problematik bestand aber nun darin ein Polyion zu finden, das nicht mit den Isocyanat-Gruppen des PCS-Präpolymers reagiert. Eine solche Reaktion ist unerwünscht, da die NCO-Gruppen vorzeitig abreagieren würden, und aus dem PCS/Polyion-Gemisch schon nach kurzer Zeit eine feste nicht mehr zu verarbeitende Masse entstünde (z.B. Alginat und PCS-Präpolymer).

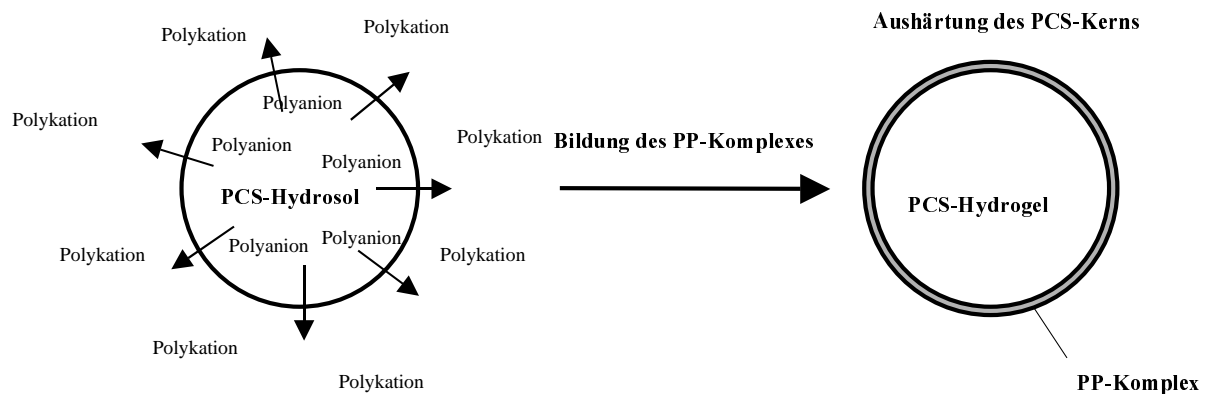


Abbildung 3-2 Formgebung mit dem PP-Komplex-Verfahren

Ein einfaches Polyanion, das diese Bedingung erfüllt, ist Polystyrolsulfonsäure. Die Sulfonsäure-Gruppen des Polymers sind nahezu inert gegenüber der Reaktion mit Isocyanaten. Als Vernetzer dient eine wässrige Lösung des Polykations Polydiallylammoniumchlorid (PDMAC). Um die optimale Konzentration für die Herstellung von PCS-Hydrogel-Kugeln zu ermitteln, wurden verschiedene Konzentrationen Polystyrolsulfonsäure (PSS) (500000 Da) mit PCS-2.5-Hydrosol vermischt und in

unterschiedlich konzentrierte PDMAC-Lösungen vertropft. Ausgewertet wurden die makroskopischen Eigenschaften der Perlenbildung.

Mit zunehmender PSS- und sinkender PDMAC-Konzentration stieg die Qualität der PCS-Hydrogelerlen. Gute Perlen erreichte man dabei nur, wenn die PSS-Konzentration 5 % betrug. War dieser Wert geringer, tendierten die Kugeln zum Schrumpfen. Bei einem Gehalt von 1 % PSS erhielt man keine festen Perlen. Der eindringende Tropfen zerlief und der PP-Komplex verschmierte über einen weiten Bereich (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1 PCS-Formgebung mit PDM und PSS

PDM\PSS	5 %	2 %	1 %
2 %	Perlen	kleine Perlen	Keine Perlen
1 %	gute Perlen	kleine Perlen	keine Perlen
0.5 %	gute Perlen	kleine Perlen	keine Perlen

Die Ergebnisse des Versuchs erklären sich wie folgt:

Die Polyanion-Konzentration in der Oberfläche des Tropfens muß hoch genug sein, um die Stabilität des Tropfens über mehrere Minuten zu gewährleisten. Sind die Scherkräfte in der gerührten Polykation-Lösung allerdings zu groß, kann die Hülle das Auslaufen des Tropfens nicht verhindern. Wenn eine stabile Kugel entstanden ist, wirkt der osmotische Druck als weitere Kraft auf ihre Form ein. Ein niedriger Druck im Inneren führt zum Austritt von Wasser und zum Schrumpfen der Kugel. Sind die Verhältnisse umgekehrt, quellen die Kugeln [61]. Allein das Aushärten des PCS-Hydrogels begrenzt beide Vorgänge und stabilisiert die erreichte Form und Größe.

3.2. Immobilisierung von autotrophen Nitrifikanten in PCS

Für den Einschluß von Bakterien wurde der Einfachheit halber auf die Kugelbildung verzichtet. Es wurden vielmehr aus dem PCS-Biomassegemisch Hydrogelmembranen gleicher Stärke gegossen (siehe Kapitel 2.3.1.2).

Die Bestimmung der Parameter für eine Optimierung der Überlebensrate war dabei das vordringliche Ziel der vorliegenden Versuche. Die Definition der Überlebensrate setzt eine Analyse der vorliegenden Bedingungen voraus.

Charakteristiken für das Leben von Mikroorganismen sind unter anderem **Vermehrung** und **Stoffwechsel**.

Vermehrung

Vermehrung von Nitrifikanten äußert sich in der Teilung der Zellen. Aus einer einzelnen Zelle entstehen nach mehreren Generationen Millionen von Individuen. Eingeschlossen in einem Hydrogel verbleiben diese Bakterien an einem gleichen Ort und bilden eine Kolonie. Die Anzahl der Kolonien könnte makroskopisch beobachtet gezählt und mit der Menge der eingeschlossenen Bakterienzahl verglichen werden. Der Quotient aus Koloniezahl und eingeschlossenen Bakterien wäre ein direktes Maß für die Überlebensrate der Spezies während der Immobilisierungsphase. Gegen diese Vorgehensweise sprechen mehrere Faktoren:

1. Die Kolonien müssen einfach zu erkennen sein, um das Auswerten auch größerer Versuchsreihen zu erlauben. Dieses ist ein Problem, wenn man, wie im Rahmen dieser Arbeit geschehen, mit Zuschlagstoffen die Hydrogele so einfärbt, daß Mikroorganismenkolonien optisch nicht von der Matrix zu unterscheiden sind.
2. Es müssen alle Hydrogelpartikel ausgezählt werden, um ein exaktes Ergebnis zu erzielen. Teilauszählungen hätten statistischen Charakter und würden das Ergebnis nur näherungsweise wiedergeben.
3. Die Versuche müßten, solange dauern, bis aus Einzelzellen sichtbare Kolonien heranwachsen. Bei Generationszeiten von mehreren Stunden oder Tagen würden die Versuche erst nach Wochen zu Ergebnissen führen.
4. Es ist schwierig den Beweis zu führen, daß jede Kolonie aus einer einzelnen Zelle entstanden ist. Bakterienzellen können nach der Teilung noch längere Zeit aneinander haften und Ketten aus mehreren Einzelzellen bilden. Ein solches Aggregat könnte dann die Basis für eine komplette Kolonie bilden.
5. Nicht jede Zelle, die den Einschluß überlebt, bildet zwangsläufig eine Kolonie. Zellen im Inneren des Hydrogels werden schlechter versorgt und wachsen langsamer oder gar nicht. Eine solche Mikrokolonie könnte leicht übersehen und nicht registriert werden.

Die fünf oben genannten Punkte sind die Belege, daß die Auszählung von Bakterienkolonien beim Einschluß von Nitrifikanten in PCS mit weiteren lichtadsorbierenden Zuschlagsstoffen nicht angewandt werden kann.

Stoffwechsel

Das zweite Kriterium des Überlebens von Zellen ist deren Stoffwechselaktivität. Der Stoffwechsel der Nitrifikanten kann anhand der Bildung der Produkte Nitrit und Nitrat erfaßt werden. Die Analyse dieser Substanzen erfolgt aus der homogenen bulk-Phase der Kulturflüssigkeit und ergibt somit einen Querschnittswert für die gesamten Hydrogelpartikel eines Versuchsansatzes. Ausgewertet wird dabei die erste festgestellte Aktivität der Mikroorganismen, da spätere Probenahmen schon das Wachstum der Zellen widerspiegeln, das in den einzelnen Hydrogelbereichen unterschiedlich sein kann.

Diese indirekte Ermittlung der Überlebensrate aus dem Stoffwechsel hat einen Nachteil. Zellen, die die Immobilisierung überleben, aber nicht aktiv sind, würden nicht registriert werden. Diese Zellen könnten sich in einem definiertem Dauerstadium befinden oder den Stoffwechsel für kurze Zeit heruntergefahren haben (inaktives Stadium).

Eine Dauerform ist jedoch bei Nitrifikanten bisher nicht beobachtet worden und schließt somit als Fehlerquelle aus [4]. Ein inaktives Stadium, daß sich in Form einer Adaption an die neuen äußeren Einflüsse darstellt, kann ca. 3 bis 5 Tage dauern. Da es jedoch hierbei um relative Untersuchungen geht, ist die Methode trotzdem zulässig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stoffwechselaktivität als Maß für die Überlebensrate herangezogen. Die Anfangsaktivität der immobilisierten Nitrifikanten spiegelt deren Überlebensrate wieder, ist mit ihr aber nicht gleichzusetzen. Sie wird in Relation (relative Anfangsaktivität) gesetzt zur Anfangsaktivität nichtimmobilisierter (freier) Zellen.

3.2.1. Immobilisierung in PCS ohne Zuschlagstoffe

Bisher wurden Nitrifikanten in PCS-Hydrogelen ohne Zuschlagstoffe immobilisiert [58]. Die pH-Wertanhebung erfolgte mit Natronlauge unter Kontrolle des pH-Wertes (siehe Tabelle 3-2).

Die Überlebensrate von Ammoniakoxidierern war in PCS-Hydrogelen sehr gering. Ihre Anfangsaktivität betrug nach dem Einschluß in PCS-Hydrogel im Vergleich zu freien nichtimmobilisierten Zellen nur 0,05 %. Die Anfangsaktivität der Nitritoxidierer betrug dagegen 22 % der Aktivität freier Zellen (Abbildung 3-3).

Tabelle 3-2 Versuchsbedingungen für Abbildung 3-3 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

PCS-Typ	PCS-2.5
Additiv	Ohne
PH-Wert	pH-Wertanhebung bis 8.0 mit NaOH
Biomasse	1 % (Standard)

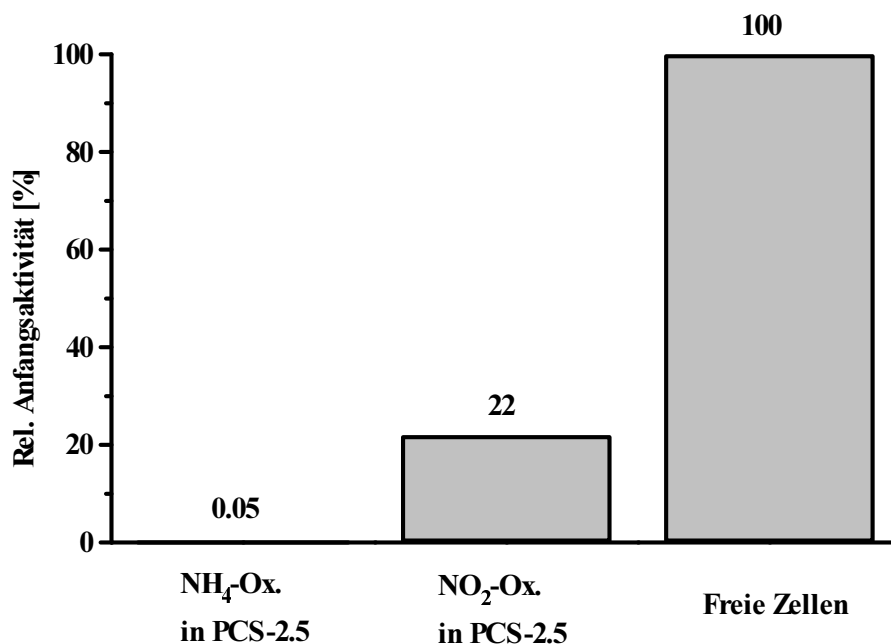


Abbildung 3-3 Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern (NH₄-Ox.) und Nitritoxidierern (NO₂-Ox.) nach der Immobilisierung in PCS-2.5-Hydrogelen im Vergleich zu freien Zellen (Kultivierung bei 30°C)

Alle bei der Synthese und Verkappung des PCS-Präpolymers beteiligten Stoffe lassen sich hinsichtlich ihres Effekts auf Nitrifikanten charakterisieren. Keine der Einzelsubstanzen zeigt eine signifikante Minderung der Aktivität der Ammoniakoxidierer [62]. Allein das Isocyanat entzieht sich aufgrund seiner hohen Reaktivität mit Wasser einer genauen Untersuchung. Da Isocyanat mit Aminogruppen noch schneller reagiert als mit Wasser, liegt der Verdacht nahe, daß NCO-Gruppen mit Teilen der Bakterienmembran reagieren und diese irreversibel schädigen [63]. In Betracht kommen dafür Enzyme in der Zellmembran, die zum Beispiel für Ammoniakoxidierer spezifisch sind und somit die hohe Schädigung erklären können. Es ist aus der Literatur bekannt, daß die Ammoniakmonooxygenase auch verschiedene organische Moleküle oxidiert oder von ihnen gehemmt wird [64], [65], [66], [67]. Das bedeutet, daß diese organischen Moleküle mit dem Enzym in Wechselwirkung treten können. Der aromatische Ring des TDI könnte, so ist anzunehmen, ebenfalls eine hohe Affinität zu diesem Enzym haben. Da die Ammoniakmonooxygenase im Prinzip das erste Glied des Energiestoffwechsels einnimmt und sich zudem in der Zellmembran befindet, könnte hier ein Angriffspunkt liegen.

Der Gehalt des freien TDI läßt sich nur schwer bestimmen, zudem liegt ein großer Teil der NCO-Gruppen verkappt und an das Präpolymer gebunden vor. Wird der pH-Wert des PCS-Hydrosols angehoben, so werden die Sulfit-Schutzgruppen abgespalten. Die Isocyanat-Gruppe schafft dann die für die Vernetzung notwendige Querverbindung. Jedoch können diese Gruppen ebenso wie das freie TDI mit den Molekülen der Bakterien reagieren. Der Unterschied zum freien TDI liegt vor allem in der eingeschränkten Bewegungsfreiheit der Makromoleküle.

3.2.2. Untersuchung geeigneter Zuschlagstoffe zur Verbesserung der Überlebensrate

Um mögliche toxische Eigenschaften des PCS-Hydrogels bzw. schädigende Verfahrensschritte während der Immobilisierung zu vermeiden, können zwei Wege beschritten werden. Der erste Weg besteht in der Auswahl und Optimierung eines Additivs, daß geeignet ist, die möglichen toxischen Eigenschaften des PCS-Hydrogels auf die Gruppe der Ammoniakoxidierer zu minimieren. Der zweite Weg besteht in der Untersuchung geeigneter Immobilisierungsbedingungen, die trotz Anwesenheit eines Toxins zu einer Verbesserung der Anfangsaktivität der besagten Bakteriengruppe führt. Die Kombination beider Optimierungsschritte sollte dann im Endergebnis die Verwendbarkeit von PCS-Hydrogelen für den Einschluß auch empfindlicher Zellen aufzeigen.

Die Zugabe von Zuschlagstoffen verfolgt zwei Ziele. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß toxische Komponenten adsorbiert werden, weiterhin könnte der Zuschlagstoff die Zellen durch äußere Blockierung vor dem Toxin schützen.

Um die Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern zu verbessern, wurde eine Reihe von Zuschlagstoffen untersucht, die diese empfindlichen Zellen beim Einschluß in PCS-Hydrogel schützen könnten. Getestet wurden die Zeolithe W894 und Zeolith Y, sowie Attagel 50 (Tonmineral), Praestol 611 und Aktivkohle (Fluka).

Die beiden Zeolithe, das Tonmineral sowie die Aktivkohle wurden als potentielle Adsorber sehr kleiner Moleküle oder Atomgruppen angesehen. Praestol 611 sollte durch Oberflächenkontakt die Bakterienzellen vor toxischen Komponenten schützen.

Lediglich die Ansätze mit Aktivkohle zeigten eine Steigerung der Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern gegenüber dem Einschluß in additivfreiem PCS. Die übrigen Zuschlagstoffe brachten kaum eine Verbesserung (Attagel 50) oder deuteten Verschlechterungen an, die durch kaum meßbare Aktivitäten gekennzeichnet waren (Tabelle 3-3).

Tabelle 3-3 Einfluß unterschiedlicher Additive auf die relative Anfangsaktivität von in PCS-Hydrogel immobilisierten Ammoniakoxidierern (PCS-2.5)

Zuschlagsstoff	Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer
Aktivkohle (Fluka)	0,67 %
Attagel 50 (Tonmineral)	0,02 %
Ohne Zuschlagstoff	0,01 %
Praestol P611	<<0,01 %
Ca-Ionen	<<0,01 %

Aktivkohle kann aus unterschiedlichen Materialien (z.B. Steinkohle, Braunkohle, Torf und Holz) und nach unterschiedlichen Verfahren (Dampfaktivierungsverfahren oder chemische Aktivierungsverfahren) hergestellt werden, deren Adsorptionseigenschaften sich deutlich voneinander unterscheiden [68].

Daher erfolgte eine Prüfung weiterer Aktivkohlen für den Einsatz als Additiv. Diese Aktivkohlen wurden von der Firma Norit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-4 Einfluß verschiedener Aktivkohlen auf die relative Anfangsaktivität von in PCS-Hydrogel immobilisierten Ammoniakoxidierern (PCS-2.5)

Zuschlagsstoff	Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer
Aktivkohle SA4	1,42 %
Aktivkohle Hydrodarco C	1,33 %
Ohne Zuschlagsstoff	0,5 %
Aktivkohle W20	0,17 %
Aktivkohle Fluka	<0,01 %

Tabelle 3-5 Versuchsbedingungen für die Versuche zu Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

PCS-Typ	PCS-2.5
Additiv	Verschiedenste Substanzen; 5 %
PH-Wertanhebung	Mit NaOH bis 7.0
Biomasse	1 % Standard

Die besten Aktivkohlen bei diesem Screening waren die Typen SA4 und Hydrodarco C. Vergleicht man diese Versuchsreihe mit der oberen, zeigen sich deutlich Unterschiede in ähnlichen Ansätzen. Der Ansatz ohne Additiv zeigt in Tabelle 3-4 eine wesentlich höhere Aktivität als in der ersten Versuchsreihe. Bei der Aktivkohle der Firma Fluka ist es genau umgekehrt. Die Ergebnisse deuten daraufhin hin, daß noch weitere Einflußfaktoren eine wesentliche Rolle spielen.

Bei der Adsorption von Molekülen wirken verschiedene Kräfte. Zum Beispiel die Van-der-Waals-Kraft. Sie gilt als maßgebliche Anziehungskraft zwischen unpolaren Molekülen. Aktivkohlen werden unter anderem in der Technik für die Adsorption von unpolaren Kohlenwasserstoffen eingesetzt [68].

Außerdem ist die Adsorption von Molekülen auch von ihrer Ladung abhängig. So besitzen geladene Moleküle in wäßriger Umgebung eine Hydrathülle, die ihren scheinbaren Radius beträchtlich erhöhen kann. Ein solches Molekül gelangt nur schwer in feinste Poren des Adsorbers. Moleküle können, abhängig von ihrer Fähigkeit Protonen aufzunehmen oder abzugeben, bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedlich geladen sein. Ihre Affinität zur Adsorption an einen Festkörper, der zudem selbst wieder Eigenladungen tragen kann, ist also vom pH-Wert abhängig.

Versuche mit den Aktivkohlen Hydrodarco C, W20 und W35 der Firma Norit zeigten, daß der pH-Wert bei dem das PCS-Hydrosol mit der Aktivkohle in Kontakt gebracht wurde einen recht unterschiedlichen Einfluß auf die Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern haben kann.

Mit sinkendem pH-Wert stieg die Aktivität bei den mit Hydrodarco C versetzten Hydrogelen. Bei den Typen W20 und W35 war es genau umgekehrt. Der letztere Fall war ein wünschenswerter Effekt, da für Gelierung und Biomassezugabe der pH-Wert sowieso angehoben werden mußte. Problematisch war allerdings, daß das PCS-Hydrosol bei mit W20 oder W35 bezuschlagten Ansätzen bei einem Inkubations-pH über 2 schon während der Inkubation ausgelirierte. Die Gelbildung von PCS mit Hydrodarco C war dagegen leichter zu handhaben. Abbildung 3-4 zeigt die Abhängigkeit der Anfangsaktivität von Nitrifikanten vom Inkubations-pH-Wert beim Gemisch Hydrodarco C/PCS.

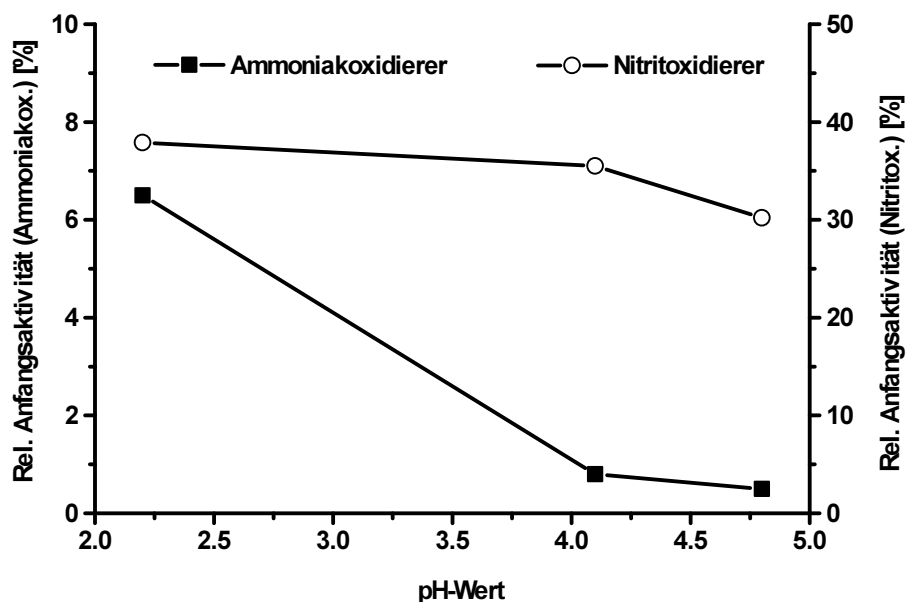


Abbildung 3-4 Relative Anfangsaktivität von immobilisierten Nitrifikanten in Abhängigkeit des Inkubations-pH-Wertes der Aktivkohle Hydrodarco C (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Die Aktivität der Nitritoxidierer sinkt nur leicht, die der Ammoniakoxidierer sehr stark mit zunehmendem Inkubations-pH-Wert.

Tabelle 3-6 Versuchsbedingungen für Abbildung 3-4 zur Herstellung von 10 ml Hydrogel (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

	Ansatz „pH 2,2“	Ansatz „pH 4,1“	Ansatz „pH 4,8“
PCS-Typ	PCS-2.5		
Additiv	Hydrodarco C (5 %)		
Inkubations-pH-Wert	400 µl	200 µl	0 µl
	HCl (1 M) je 10 g Hydrogel		
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)		
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl	80 µl	0 µl
	NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel		
2. Anhebung des pH-Wertes und Pufferung	400 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1M) je 10 g Hydrogel		
Biomassezugabe	1 % (Standard)		

3.2.3. Versuche mit Hydrodarco C

Bei den weiteren Versuchen wurde ausschließlich die Aktivkohle Hydrodarco C verwendet. Dabei wurden verschiedene Parameter variiert, um das Verfahren der Einschlußimmobilisierung für autotrophe Nitrifikanten hinsichtlich der Anfangsaktivität zu optimieren. Die Versuche mit Hydrodarco C sind auch für andere in den Screeningtests erfolgreichen Aktivkohlen (Typen W20, W35 und SA4) exemplarisch.

3.2.3.1. Variation der Menge

Der erste Parameter, der untersucht werden sollte, war die Beladung der Hydrogele mit dem Additiv. In den bisherigen Versuchen wurde eine Beladung von 5 % an der Gesamtmasse des Hydrogels eingesetzt. Dieser Anteil wurde nach oben und nach unten variiert. Bei der Variation zu höheren Werten ergab sich das Problem, daß diese Ansätze während der Inkubationszeit gelierten. Die Ansätze mit 1, 2 und 5 % Aktivkohle führten dagegen zu gut ausgelierten Gelen. In einer parallelen Versuchsreihe wurde die Kontaktzeit zwischen Aktivkohle und Hydrogel vor der Biomassezugabe variiert. Dabei wurde die als Standard verwendete 90 minütige (1,5 h) mit einer 24 stündigen Kontaktzeit verglichen. Die Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer steigerte sich in beiden Versuchsreihen exponentiell in Abhängigkeit von der Aktivkohlebeladung. Ein wesentlich längerer Inkubationszeitraum verbesserte die Anfangsaktivität nicht. Die Ansätze mit eintägiger Inkubation zeigten im Gegenteil alle niedrigere Werte an, als bei den vergleichbaren Versuchen mit 90 minütiger Inkubationszeit (Abbildung 3-5).

Eine Erklärung für den exponentiellen Anstieg findet man unter der Annahme, daß die Aktivkohle vermutlich mit dem vorliegende Toxin gesättigt ist. Dadurch steigt die Konzentration des ungebundenen Giftstoffs mit sinkender Beladung. Schon eine Reaktion 1.

Ordnung (bezüglich der Toxinkonzentration) mit den Mikroorganismen kann zu dem vorliegendem Ergebnis führen. Aufgrund der geringen Datenmenge läßt sich eine Reaktionsordnung jedoch nicht abschätzen.

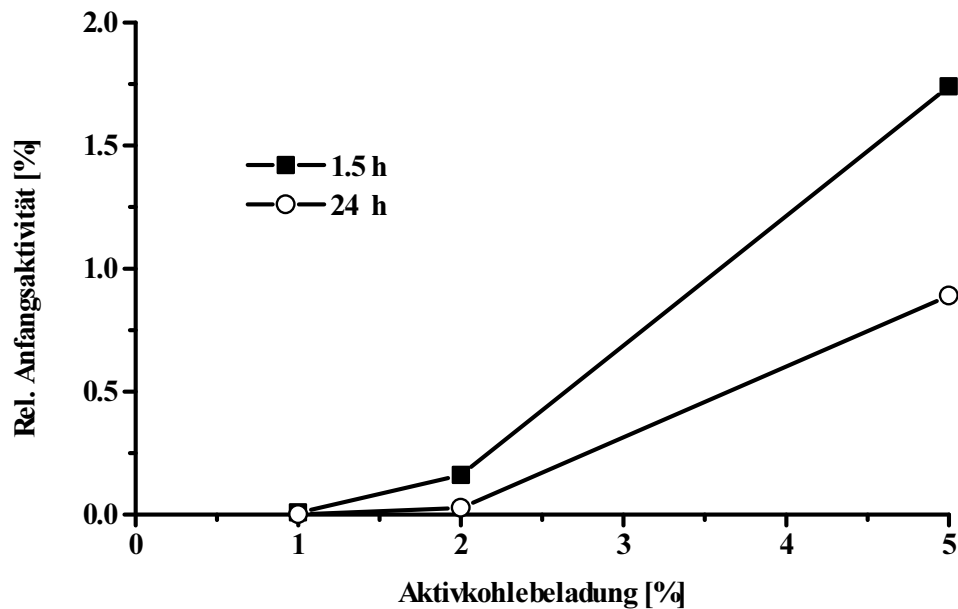


Abbildung 3-5 Relative Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern in Abhängigkeit von der Aktivkohlebeladung (Hydrodarco C) und der Inkubationszeit (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-7 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-5 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

PCS-Typ	PCS-2.5
Additiv	Hydrodarco C Variabler Anteil 1 bis 5 %
Inkubations-pH-Wert	mit HCl (1 M) auf pH 0
Inkubationszeit	1,5 oder 24 h
Anhebung des pH-Wertes	Mit NaOH (100 g/l) auf pH 7.0
Biomassenzugabe	1 % (Standard)

3.2.3.2. Einfluß der Biomasse

Der Einfluß der Biomasse auf den Immobilisierungsvorgang gliedert sich in einen quantitativen und qualitativen Aspekt. Der quantitative Aspekt entspricht dem Biomassegehalt im Hydrogel. Dieser könnte eine Rolle bei der Immobilisierung spielen, wenn man von der Überlegung ausgeht, daß durch eine höhere Beladung das Toxin/Zellzahl-Verhältnis sinkt und damit ein größerer Anteil der Mikroorganismen überlebt.

Die Aktivität und damit gewissermaßen der Zustand der immobilisierten Biomasse, stellt den qualitativen Aspekt dar. Die absolute Stoffwechselleistung der Ammoniakoxidierer kann als ein Indikator für die Qualität der Mikroorganismen angesehen werden. Wie in der Literatur bekannt, sind die ersten Schritte der Ammoniakoxidation energieaufwendig, so daß eine in ihrer Aktivität geminderte Kultur erst nach längerer lag-Phase ihre volle Wachstumsrate erreicht [69]. Eine solche negativ beeinflusste Kultur könnte durch die Immobilisierung weiter geschwächt werden, so daß sich beide Negativfaktoren summieren. Es besteht zudem die Möglichkeit, daß die Nitritoxidation ebenfalls von der Ammoniakoxidation abhängig sein kann [8], [70].

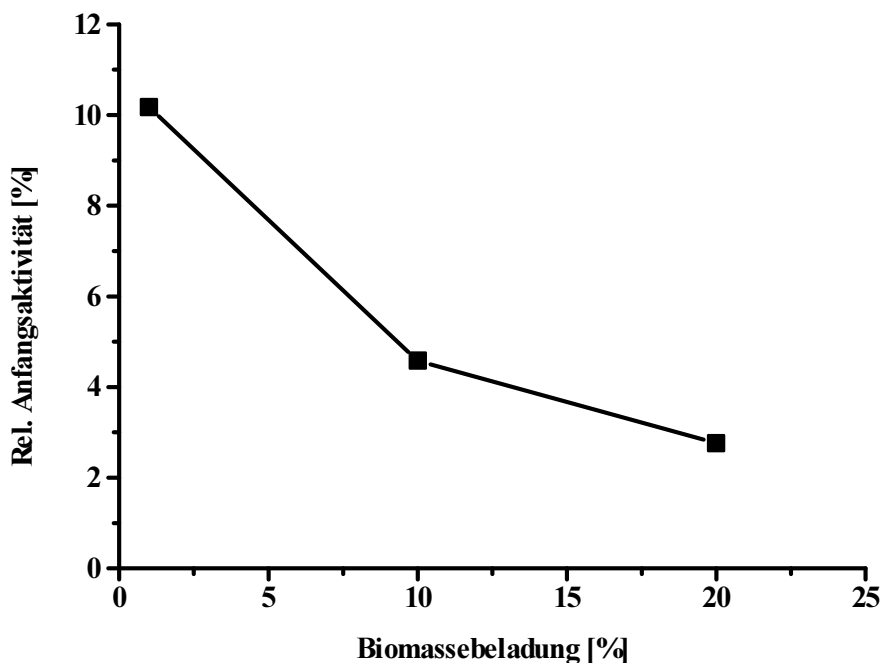


Abbildung 3-6 Relative Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern in Abhängigkeit von der Beladung (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Versuche zeigten, daß die relative Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern mit zunehmender Biomassebeladung sank, wenngleich die absolute Aktivität stieg. Ein positiver Effekt durch einen höheren Biomasseanteil (z.B. der oben geschilderten Verringerung des Toxin/Zellmasse-Verhältnisses) war nicht festzustellen (Abbildung 3-6). Sofern es einen solchen Effekt gibt, wird dieser durch den verschlechterten Katalysatorwirkungsgrad

überdeckt. Der Wirkungsgrad sinkt, weil mehr Biomasse mehr Substrat benötigt, das dann nicht durch den Transport in vollem Umfang zur Verfügung gestellt werden kann.

Tabelle 3-8 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-6 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

PCS-Typ	PCS-2.5
Additiv	Hydrodarco C (5 %)
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCl (1M) je 10g Hydrogel => pH2,2
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel
2. Anhebung des pH-Wertes und Pufferung	400 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1M) je 10 g Hydrogel
Biomassezugabe	1 % (Standard)

Dagegen ist eine eindeutige Abhängigkeit der Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer von der absoluten Aktivität freier Zellen zu erkennen (Abbildung 3-7).

Lag die Überlebensrate bei einer Aktivität der freien Zellen von 0,05 mM/h bei unter 5 %, so stieg sie ab ca. 0,020 mM/h auf etwa 23 % (Abbildung 3-7). Daraus folgt, daß die Aktivität der Biomasse vor dem Einschluß einen starken Einfluß auf die Immobilisierung in PCS-Hydrogelen hat. Man kann davon ausgehen, daß die Abwehr des Toxins oder der Ausgleich einer toxischen Schädigung durch vitalere Zellen besser erreicht wird als durch Zellen, die nur schwache Aktivität zeigen.

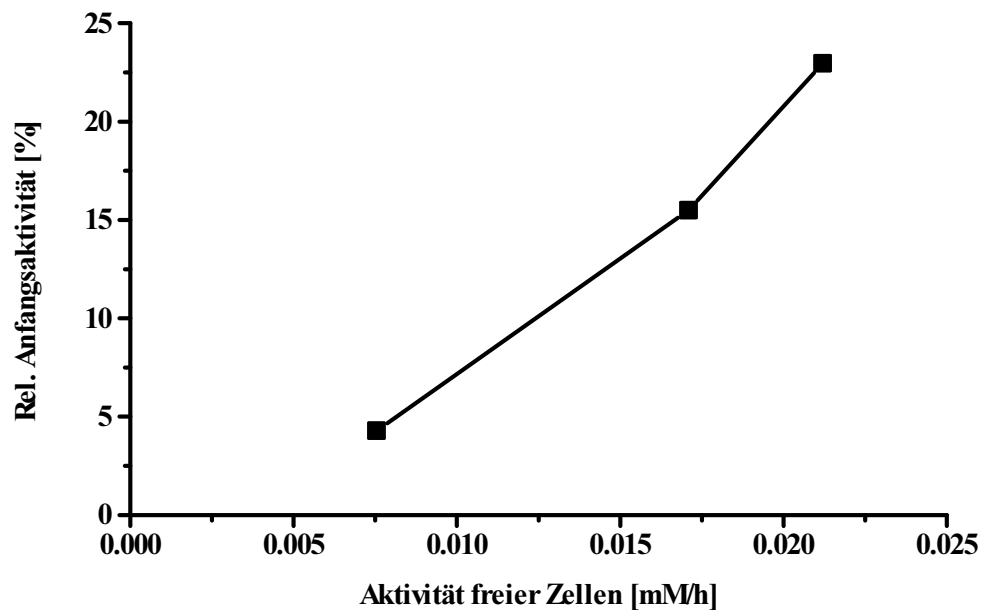


Abbildung 3-7 Einfluß der Aktivität der freien Ammoniakoxidierer auf die relative Anfangsaktivität von immobilisierten Zellen (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Die relative Anfangsaktivität der Nitritoxidierer ist dagegen unabhängig von der absoluten Aktivität der freien Zellen. Die Aktivitäten liegen nahezu konstant in einem Intervall von 30 bis 40 % (Abbildung 3-8).

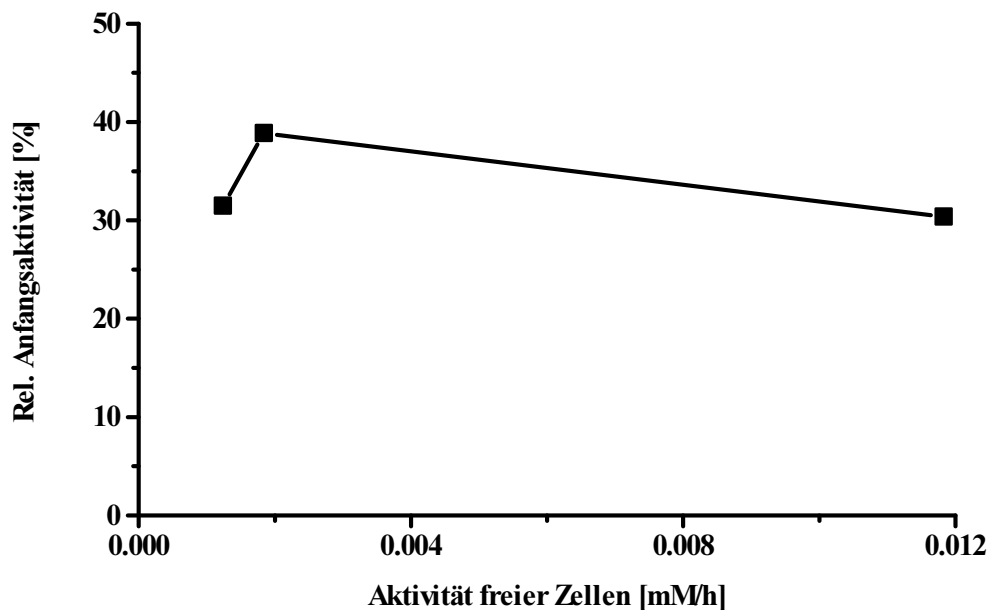


Abbildung 3-8 Einfluß der Aktivität der freien Nitritoxidierer auf die relative Anfangsaktivität von immobilisierten Zellen (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-9 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-7 und Abbildung 3-8 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

PCS-Typ	PCS-2.5
Additiv	Hydrodarco C (5 %)
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCl (1M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel
2. Anhebung des pH-Wertes und Pufferung	400 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel
Biomassezugabe	1 % (Standard)

3.2.3.3. Einfluß des Substrates

Als weitere Frage ergab sich, ob das Substratangebot eine Rolle der bei Auswertung der Versuchsreihen spielt. Die Substratkonzentration kann an dieser Stelle nicht als Parameter herangezogen werden, da unterschiedliche Substratgehalte zu unterschiedlichem Transport-Reaktionsverhalten der Immobilisate führen. Ein solcher Versuch würde also lediglich Aussagen über den Katalysatorwirkungsgrad und nicht über die Überlebensrate machen. Die Nitritkonzentration kann einen Einfluß auf die Ammoniakoxidierer und Ammonium einen Einfluß auf die Nitritoxidierer haben kann [8], [21], [71]. Im Unterschied zu freien Zellen besteht bei Immobilisaten die Möglichkeit, daß die jeweils hemmende Verbindung ebenfalls im Immobilisat verbraucht wird und es zu einer diffusionsbedingten Senkung der Konzentration kommt. Das bedeutet, daß der Einfluß der Substanz in Immobilisaten und freien Kulturen unterschiedlich sein kann.

Versuche mit Immobilisaten zeigten, daß die Ammoniakoxidierer durch die geringe Nitritkonzentration von 10 mMol in den Versuchsansätzen nicht beeinflußt wurden. Der Einfluß von Ammonium auf Nitritoxidierer war dagegen erkennbar. Die Hemmung erreichte Werte von 15 bis 20 %. Das bedeutet, daß die Meßergebnisse für Nitritoxidierer in Versuchen mit Ammonium und Nitrit nach oben korrigiert werden müssen.

3.2.3.4. Einfluß der Gelmatrix

Ein weiterer Faktor, der betrachtet werden soll, ist der Einfluß den die Hydrogelbildung auf die Mikroorganismen ausübt.

Gibt man autotrophe Nitrifikanten zu verschiedenen Zeitpunkten zum langsam ausgiehenden Gel hinzu, zeigt sich deutlich, daß die Reaktion der Vernetzung ein wesentlicher Hemmfaktor für die Überlebensrate ist. Die Aktivität der Ammoniakoxidierer steigerte sich jedoch um die Hälfte auf 0,2 %, wenn die Biomasse erst nach 10 Minuten ab Beginn der Gelierung zugegeben wurde. Die Anfangsaktivität der Nitritoxidierer blieb bei 40 %, zeigte also keine Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Biomassezugabe. Es wurde ein niedriger pH-Wert (ca. 7) gewählt, damit der Prozeß relativ langsam ablief. Die Zeitdauer von der Biomassezugabe bis zum kompletten Ausgiehen der Gele war in beiden Versuchen gleich (Abbildung 3-9).

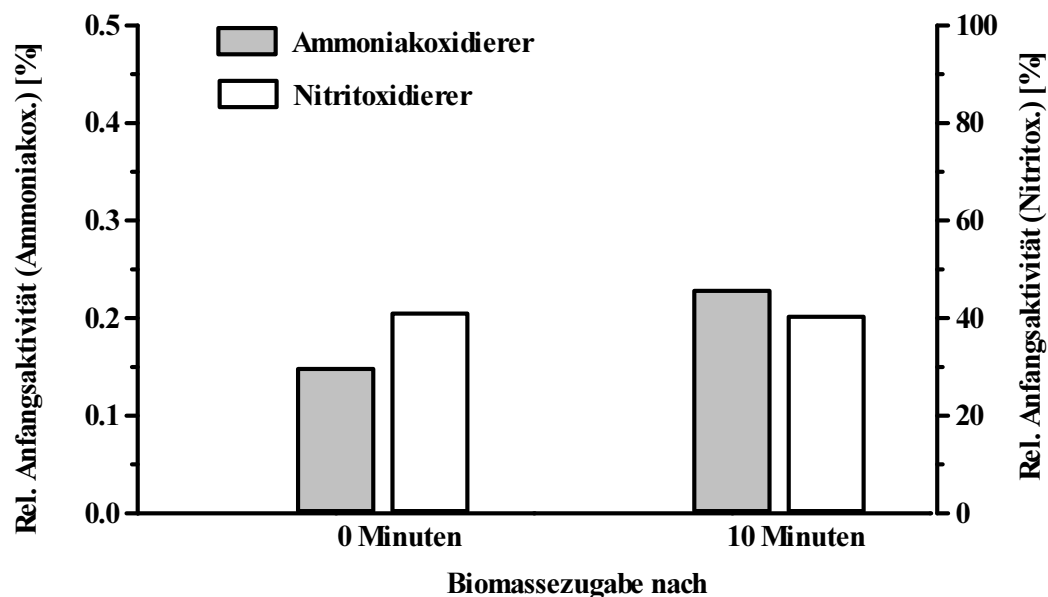


Abbildung 3-9 Einfluß des Zeitpunktes der Biomassezugabe zu langsam ausgelierendem PCS-Hydrogel auf die relative Anfangsaktivität von Nitrifikanten (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-10 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-9 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

	Ansatz „0 Minuten“	Ansatz „10 Minuten“
PCS-Typ	PCS-2.5	
Additiv	Hydrodarco C	
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCL (1M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2	
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)	
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100g/l) je 10 g Hydrogel	
2. Anhebung des pH-Wertes	300 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1M) je 10 g Hydrogel	
Wartezeit	0 min	10 min
Biomassezugabe	1 % (Standard)	
Wartezeit	10 min	10 min
3. Anhebung des pH-Wertes	100 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel	

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Gesamtgelierungszeit konstant gehalten und die Kontaktzeit zwischen Biomasse und ausgelierendem Hydrogel variiert. Dieses wurde dadurch

erreicht, daß nach Inkubation des PCS-Hydrosols mit der Aktivkohle Hydrodarco C der pH-Wert der Lösung mit tri-Natrium-Phosphat auf ca. pH 7 eingestellt wurde. Im ersten Versuchsansatz wurde die Biomasse sofort, im zweiten Ansatz nach fünf Minuten zugegeben. Nach insgesamt 10 Minuten wurde der pH-Wert so erhöht, daß die Lösung innerhalb weniger Sekunden gelierte.

Bei halber Gelkontaktzeit steigerte sich die Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer um mehr als das Doppelte, auf 0,9 %. Bei den Nitritoxidierern war ebenfalls eine deutliche Steigerung auf über 40 % zu erkennen (Abbildung 3-10).

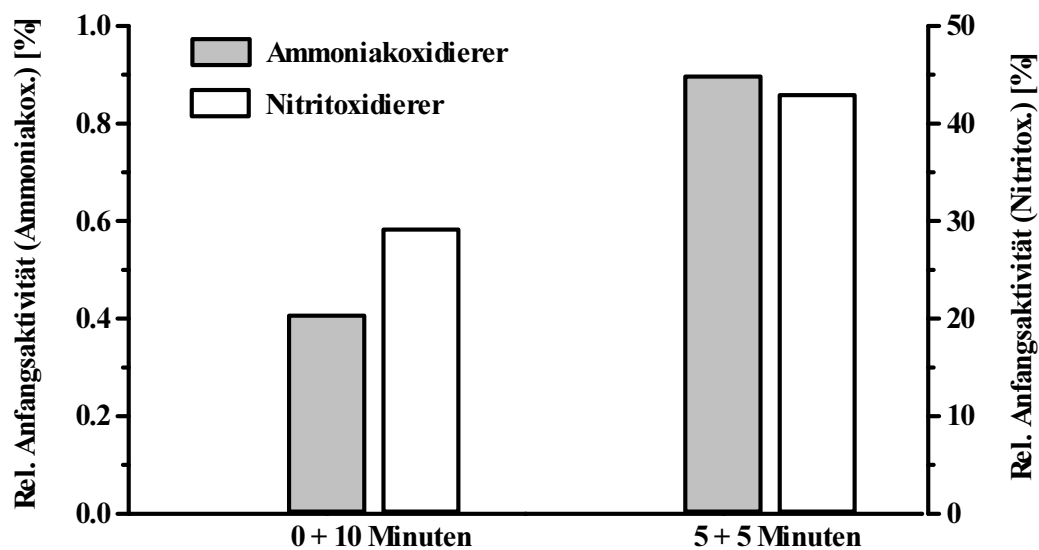


Abbildung 3-10 Einfluß der Gelkontaktdauer bis zur Aushärtung auf die relative Anfangsaktivität von in PCS-Hydrogelen immobilisierten Nitrifikanten (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-11 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-10 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

	Ansatz „0 + 10 Minuten“	Ansatz „5+5 Minuten“
PCS-Typ	PCS-2.5	
Additiv	Hydrodarco C	
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCL (1M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2	
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)	
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel	
2. Anhebung des pH-Wertes	300 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel	
Wartezeit	0 min	5 min
Biomassezugabe	1 % (Standard)	
Wartezeit	10 min	5 min
3. Anhebung des pH-Wertes	150 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel	

Wie die vorherigen Ergebnisse zeigen, war die Vernetzungsdauer sowie der Zeitpunkt der Biomassezugabe während der Gelierung von maßgeblicher Bedeutung für das Überleben der Ammoniakoxidierer. Die Gelierungsdauer des PCS-Hydrosols ist jedoch abhängig vom pH-Wert der Lösung [24]. Beide Faktoren lassen sich also nicht unabhängig voneinander variieren.

In den nächsten drei Versuchsreihen, wird der pH-Wert zu unterschiedlichen Zeiten variiert. Nach der oben stehenden Aussage wurde dabei auch die Gelierungszeit beeinflusst. Gab man Nitrifikanten zu PCS-Hydrosol mit unterschiedlichen pH-Werten, zeigte sich, daß sich die Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer exponentiell mit dem pH-Wert erhöhte. Die Anfangsaktivität der Nitritoxidierer stieg dagegen nur linear. Die pH-Werte des PCS-Hydrosols waren in dieser Versuchsreihe vom Zeitpunkt der Biomassezugabe bis zum vollständigen Ausgelieren konstant (Abbildung 3-11).

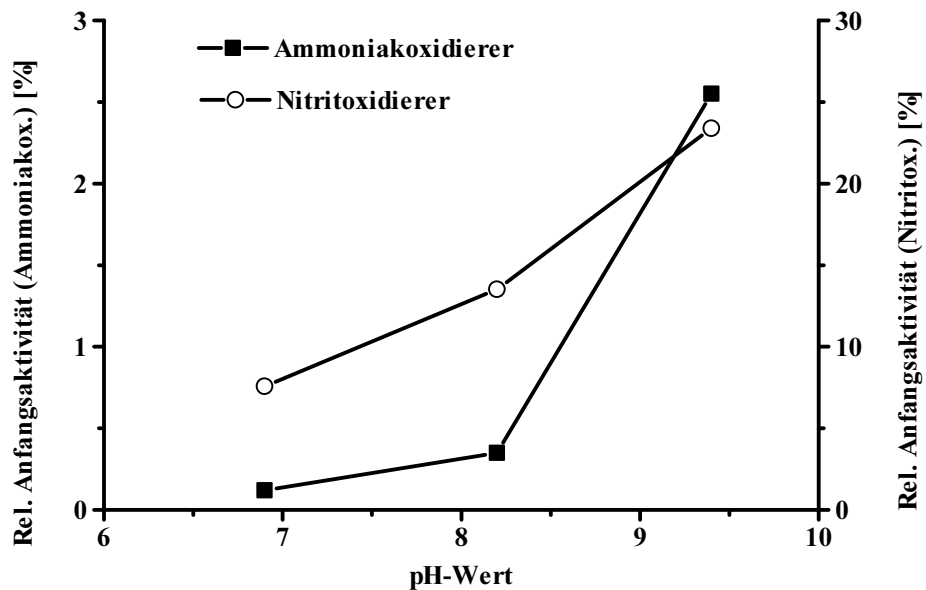


Abbildung 3-11 Relative Anfangsaktivität von Nitrifikanten in Abhängigkeit vom pH-Wertes der Zugabe und der Aushärtung (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-12 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-11 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

	Ansatz „pH 6,9“	Ansatz „pH 8,2“	Ansatz „pH 9,4“
PCS-Typ	PCS-2.5		
Additiv	Hydrodarco C		
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCL (1M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2		
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)		
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100g/l) je 10g Hydrogel		
2. Anhebung des pH-Wertes	150 µl	300 µl	450 µl
	K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel		
Biomassezugabe	1 % (Standard)		

Es stellte sich die Frage, ob der pH-Wert der Lösung oder die Dauer der Gelierung, die daraus resultiert, für diese starke Abhängigkeit verantwortlich ist.

pH-Wert

Um dies zu untersuchen, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der pH-Wert der Biomassezugabe variiert, dieser jedoch nach genau einer Minute in allen Versuchen auf den Wert des höchsten Ansatzes angehoben. Dadurch wurde erreicht, daß die Zeit bis zum Ausgelieren in allen Ansätzen gleich lang war. Die Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer korreliert mit dem pH-Wert, der bei der Zugabe zum flüssigen Hydrogel herrscht. Mit höherem pH stieg die Überlebensrate linear an. Der Einfluß des Zugabe-pH-Wertes auf die Nitritoxidierer war dagegen im Bereich von pH 6,8 bis 8,2 nahezu konstant und stieg erst bei pH 9,4 deutlich an (Abbildung 3-12).

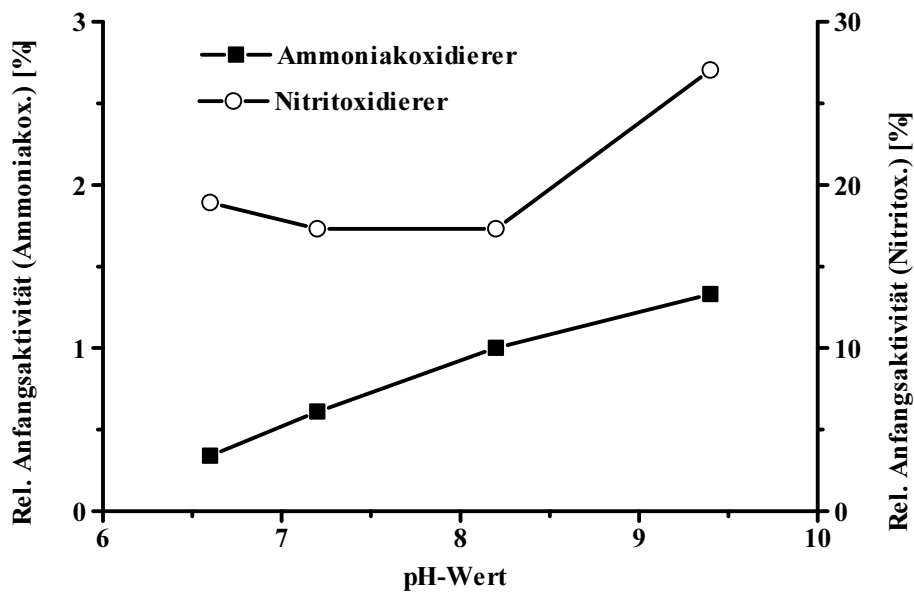


Abbildung 3-12 Relative Anfangsaktivität von Nitrifikanten in Abhängigkeit zum pH-Wert zum Zeitpunkt der Biomassezugabe (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-13 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-12 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

	Ansatz „pH 6,9“	Ansatz „pH 7,2	Ansatz „pH 8,4“	Ansatz „pH 9,4“
PCS-Typ	PCS-2.5			
Additiv	Hydrodarco C			
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCL (1 M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2			
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)			
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel			
2. Anhebung des pH-Wertes	100 µl	200 µl	300 µl	450 µl
	K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel			
Wartezeit	1 min			
Biomassezugabe	1 % (Standard)			
3. Anhebung des pH-Wertes	350 µl	250 µl	150 µl	0 µl
	K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel			

Gelierungsdauer

Um die Gelierungsdauer zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuch die Biomasse in allen Ansätzen bei pH 6,8 zugegeben und anschließend der pH-Wert zum Ausgelieren auf unterschiedliche Werte erhöht.

Die Anfangsaktivität beider Bakteriengruppen zeigte eine starke Abhängigkeit von der Zeitdauer der Aushärtung. Die Abhängigkeit vom pH-Wert war exponentiell, wobei sie sich bei den Ammoniakoxidierern noch stärker ausgeprägte (Abbildung 3-13).

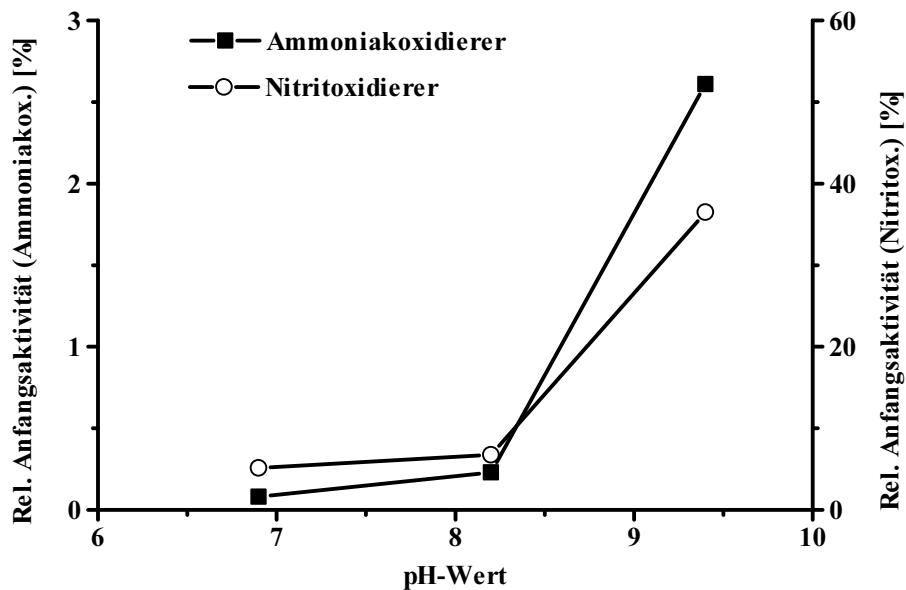


Abbildung 3-13 Relative Anfangsaktivität von Nitrifikanten in Abhängigkeit vom pH-Wert der Aushärtung (PCS-2.5; Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-14 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-13 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

	Ansatz „pH 6,9“	Ansatz „pH 8,2	Ansatz „pH 9,4“
PCS-Typ	PCS-2.5		
Additiv	Hydrodarco C		
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCL (1 M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2		
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)		
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel		
2. Anhebung des pH-Wertes	150 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel		
Biomassezugabe	1 % (Standard)		
Wartezeit	1 min		
3. Anhebung des pH-Wertes	0 µl	150 µl	300 µl
	K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel		

3.2.4. Verringerung der Menge toxischer Stoffe

Im vorherigen Kapitel wurde geschildert, wie es möglich ist, durch die Zugabe von Additiven und der Optimierung des pH-Wertes während der Immobilisierungsphase die Überlebensrate insbesondere der Ammoniakoxidierer positiv zu beeinflussen. Ein anderer Ansatz, um die Anfangsaktivität zu erhöhen, besteht darin, die Konzentration möglicher toxischer Stoffe (z.B. Isocyanat-Gruppen) schon während der Synthese des PCS-Präpolymers, zu senken. Dazu wurde in weiteren Versuchen angestrebt, den TDI-Anteil bei der Synthese der Hydrogele zu verringern. Es mußte jedoch beachtet werden, daß sich mit sinkendem NCO/OH-Verhältnis die Stabilität der Gele durch unzureichende Quervernetzung während der Gelierungsphase verringern kann.

Neben dem in den bisherigen Versuchen verwendeten PCS-Präpolymer mit einem NCO/OH-Verhältnis von 2,5 :1 (PCS-2.5) wurden Präpolymere mit Verhältnissen von 2,0:1 (PCS-2.0), 1,8:1 (PCS-1.8) und 1,4:1 (PCS-1.4) synthetisiert.

Mit den vier PCS-Typen wurden Immobilisierungsversuche durchgeführt. Dabei wurde besonders der Parameter Gelierungszeit sekundengenau verfolgt, da eine starke Abhängigkeit der Anfangsaktivität von der Gelierungszeit zu erwarten war.

Die Ergebnisse zeigen: Je geringer das NCO/OH-Verhältnis desto höher ist die Überlebensrate der ammoniakoxidierenden Bakterien. Wie im schon im vorherigen Abschnitt für PCS-2.5 dargestellt, erhöht sich die Anfangsaktivität auch bei allen anderen PCS-Typen mit steigendem Gelierungs-pH-Wert (Abbildung 3-14). Deutlich wird auch, daß die Überlebensrate mit wachsender Gelierungszeit rasch absinkt (Abbildung 3-15).

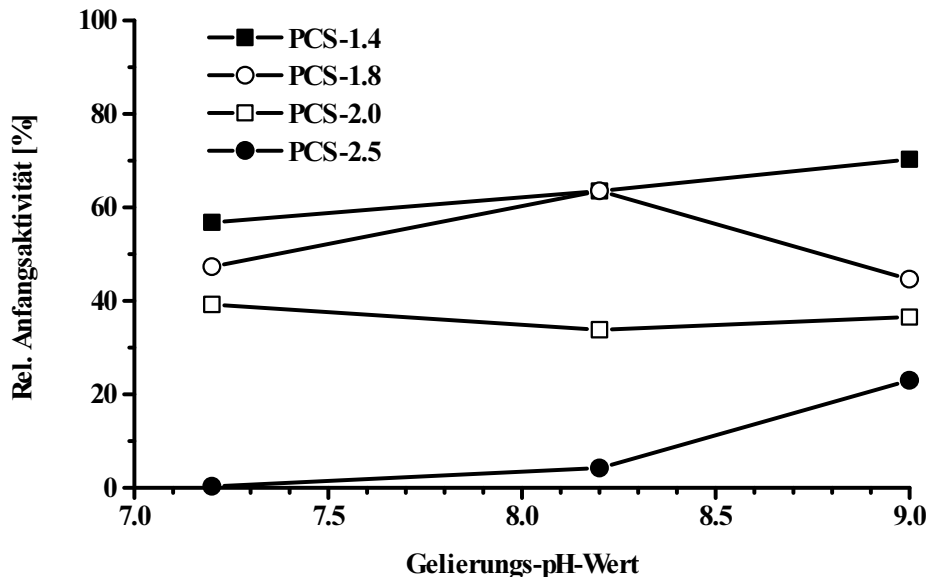


Abbildung 3-14 Einfluß des Gelierungs-pH-Wertes bei unterschiedlichen NCO/OH-Verhältnissen auf die relative Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern (Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium)

Die Ammoniakoxidierer erreichten mit PCS-1.4 und einer Gelierungszeit von 27 Sekunden eine Anfangsaktivität von über 70 %. Der niedrigste Wert lag mit PCS-2.5 und einer Gelierungszeit von fast 1500 Sekunden bei nahezu 0 %.

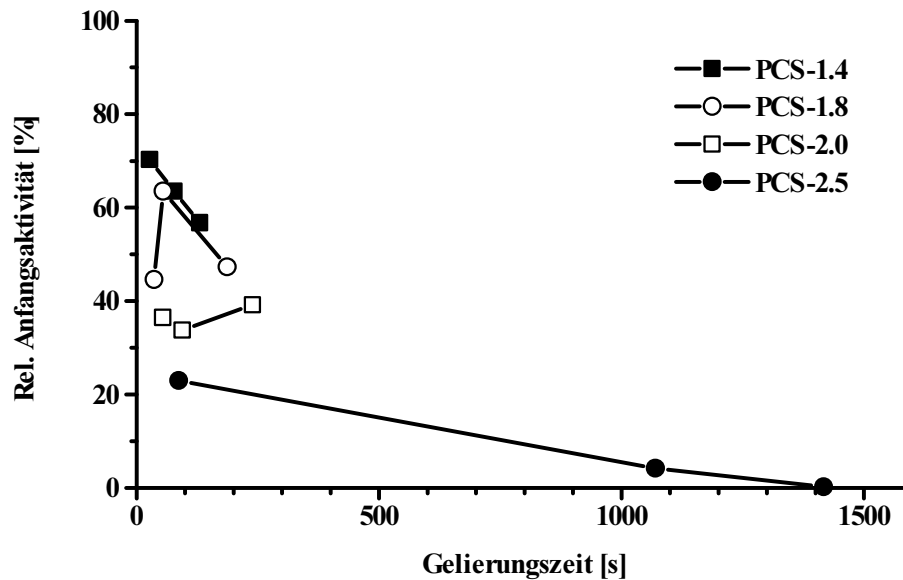


Abbildung 3-15 Einfluß der Gelierungszeit bei unterschiedlichen NCO/OH-Verhältnissen auf die relative Anfangsaktivität von Ammoniakoxidierern (Kultivierung bei 30°C; 10 mM Ammonium)

Die Nitritoxidierer zeigten ebenfalls eine Abhängigkeit vom NCO:OH-Verhältnis. Jedoch war diese nur relativ schwach ausgeprägt. Ebenso schwach ausgeprägt war die Abhängigkeit vom Gelierungs-pH-Wert und der Gelierungszeit (Abbildung 3-16 und Abbildung 3-17).

Die Anfangsaktivität der Nitritoxidierer schwankte nur zwischen 20 und 40 %. Bei kurzen Gelierungszeiten war kaum ein Unterschied zwischen den Anfangsaktivitäten der verschiedenen PCS-Typen zu erkennen.

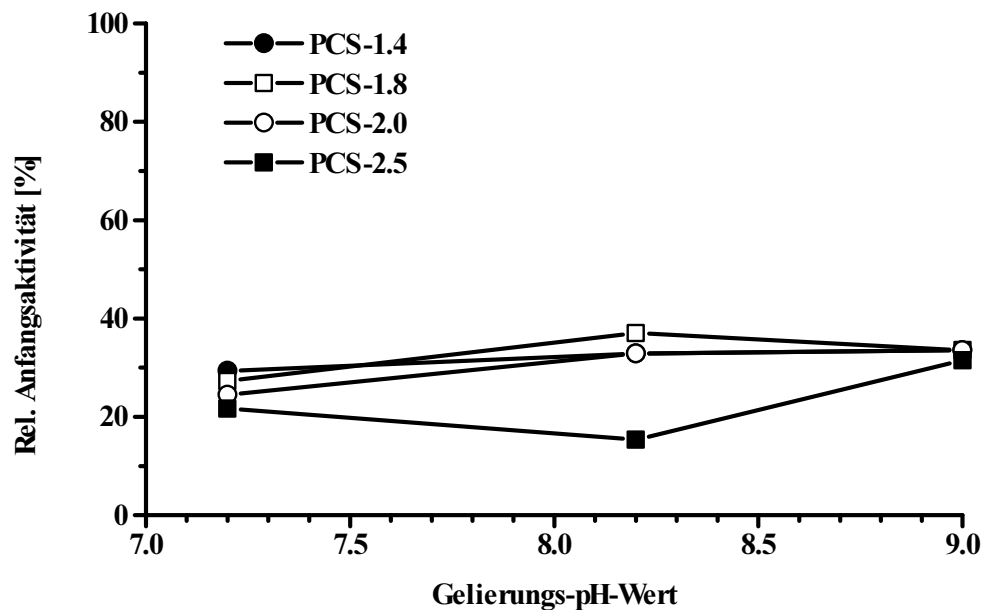


Abbildung 3-16 Einfluß des Gelierungs-pH-Wertes und des NCO/OH-Verhältnisses auf die relative Anfangsaktivität von Nitritoxidierern (Kultivierung bei 30°C; 10 mM Nitrit)

Ein geringeres NCO/OH-Verhältnis bei der Synthese der PCS-Präpolymere führt zu einem geringeren Gehalt an freiem TDI. Diese kleinere Menge kann von der Aktivkohle Hydrodarco C sehr erfolgreich abgefangen werden. Ohne den Einsatz des Additivs reicht die geringere Toxinkonzentration trotzdem aus, die Anfangsaktivität der Ammoniakoxidierer auf nahezu Null zu senken.

Die Gelierungszeit ist der Zeitraum, in der nichtverkappte Isocyanatgruppen vorliegen und Zellen schädigen können. Daher ist die starke Abhängigkeit der Überlebensrate von diesem Parameter verständlich.

Durch die Verringerung des NCO/OH-Verhältnisses werden die Abstände zwischen den Kontaktpunkten im dreidimensionalen Gelnetzwerk größer. Die Frage, ob dies einen Einfluß auf die Stabilität der Gele hat, soll im nächsten Kapitel geklärt werden.

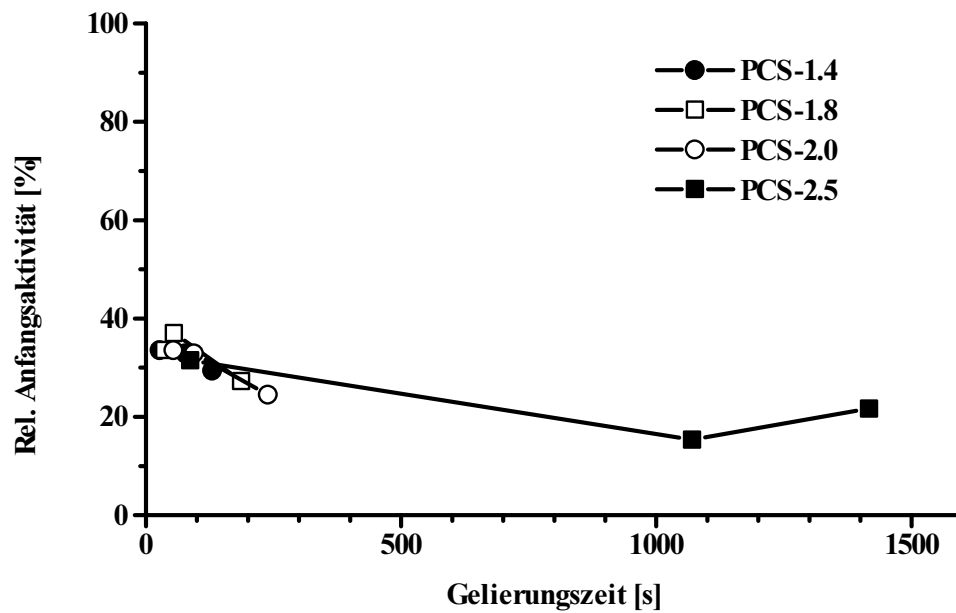


Abbildung 3-17 Einfluß der Gelierungszeit und des NCO/OH-Verhältnisses auf die relative Anfangsaktivität von Nitritoxidierern (Kultivierung bei 30°C; 10 mM Nitrit)

Tabelle 3-15 Versuchsbedingungen zu Abbildung 3-14 bis Abbildung 3-17 (Beschreibung der Gelierung siehe Kapitel 2.3.1.2)

PCS-Typen	PCS-1.4, PCS-1.8, PCS-2.0 und PCS-2.5
Additiv	Hydrodarco C (5 %)
Inkubations-pH-Wert	400 µl HCl (1M) je 10 g Hydrogel => pH 2,2
Inkubationszeit	90 Minuten (Standard)
1. Anhebung des pH-Wertes	160 µl NaOH (100 g/l) je 10 g Hydrogel
2. Anhebung des pH-Wertes und Pufferung	Variabel 200, 300 oder 400 µl K ₃ PO ₄ -Lösung (1 M) je 10 g Hydrogel
Biomassezugabe	1 % (Standard)

3.3. Mechanische und physikalische Charakterisierung

3.3.1. Mechanische Stabilität der Hydrogele

Immobilisate sind in Reaktoren Scherkräften ausgesetzt, die durch die Rührorgane erzeugt werden. Zudem unterliegen sie einer ständigen Prallbeanspruchung. Die mechanische Stabilität spielt also eine große Rolle bei der Wahl des eingesetzten Immobilisierungsmaterials. PCS ist, wie schon einleitend geschildert, ein Derivat des Polyurethans. Bei der Quervernetzung zwischen den einzelnen Ketten entstehen wie beim Polyurethan kovalente Bindungen. Die Dichte dieser Bindungsstellen im Hydrogel ist abhängig von der Anzahl verkappter NCO-Gruppen. Da bei der Reduzierung des NCO/OH-Verhältnisses während der Synthese eines verbesserten PCS die Anzahl der reaktiven Gruppe verringert wurde, besteht die Gefahr, daß die Stabilität der Hydrogele darunter leidet. Die mechanische Stabilität kann durch die Messung des elastischen Verhaltens charakterisiert werden.

Das E-Modul (E_t) berechnet sich nach:

$$E_t = \frac{\Delta F}{\Delta \varepsilon \cdot A_0} \quad (\text{Gl. 3-1})$$

Die Messung des elastischen Verhaltens erfolgte durch Zugversuche einzelner PCS-Hydrogelformkörper. Diese Messung ist analog zu DIN 53504, jedoch besaßen die Gelstreifen nicht die Form gemäß dieser Norm. Dadurch können diese Werte nur als relativer Vergleich angesehen werden.

Abbildung 3-18 zeigt das Elastizitätsmodul für verschiedene PCS-Typen. Das Modul blieb auch bei Variation des NCO/OH-Verhältnisses über einen weiten Bereich konstant über 6000 Pa. Erst bei einem Verhältnis von 1,4:1 sank das E-Modul stark auf nahezu ein Sechstel des Wertes (Abbildung 3-18).

Die Abnahme des E-Moduls beim PCS-1.4 kann auf weite Abstände zwischen den kovalenten Bindungspunkten zwischen den Ketten zurückgeführt werden [72].

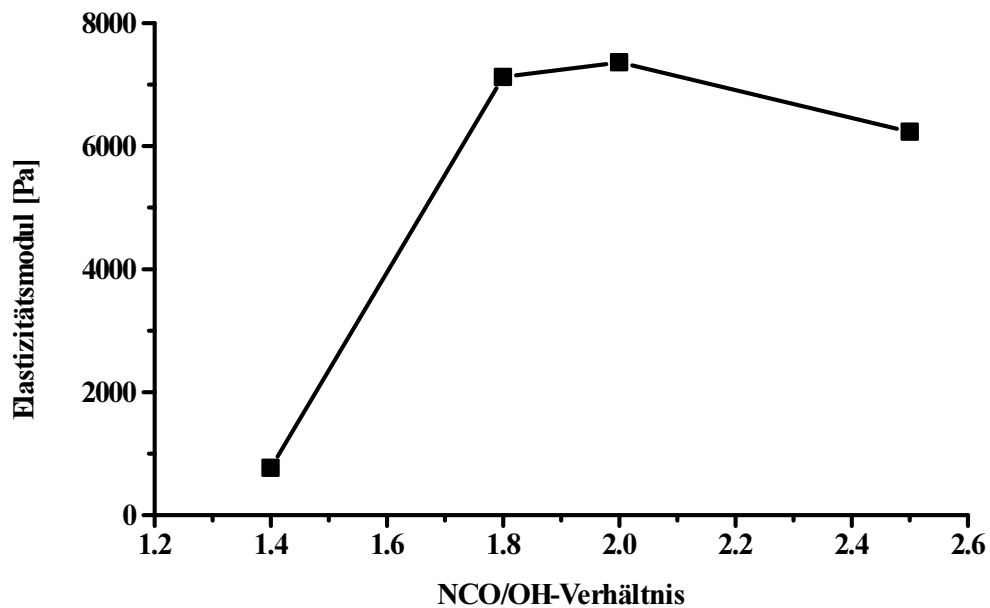


Abbildung 3-18 Elastizitätsmodul in Abhängigkeit von NCO/OH-Verhältnis im Hydrogel

Die oben geschilderten Werte wurden für reine PCS-Hydrogele ermittelt. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man den Einfluß von Hydrogelen mit Zusätzen betrachtet. 5 % Aktivkohleanteil am Hydrogel erhöhen das E-Modul um über 50 %. Feststoffe erhöhen das E-Modul eines Kunststoffes in Abhängigkeit zur Konzentration und ihrer Oberfläche. Es ist anzunehmen, daß ähnliches auch für Hydrogele gilt [73]. 5 % Polystyrolsulfonsäure senkten das Elastizitätsmodul um 50 % (Abbildung 3-19). Das Formgebungsmittel führte damit zu weicherem Gelen.

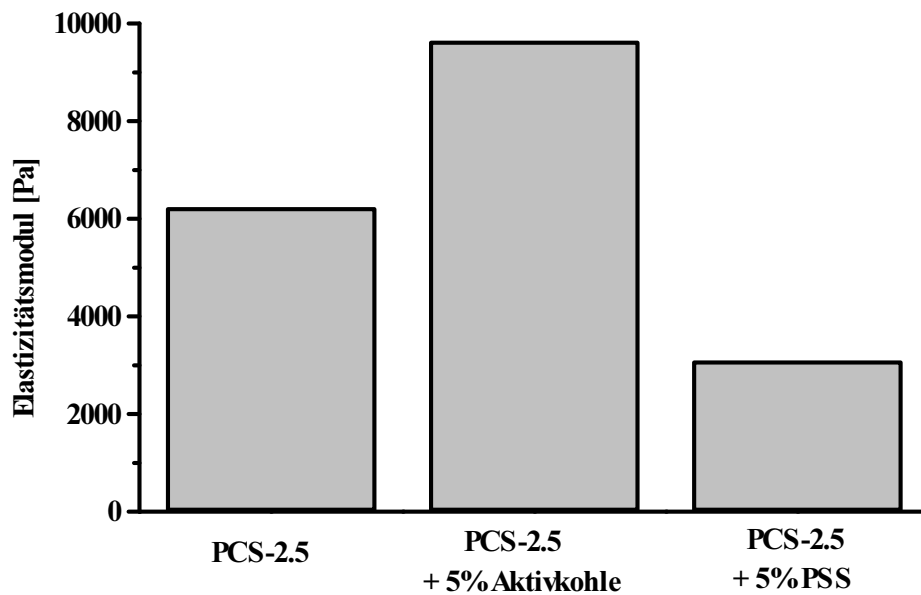


Abbildung 3-19 Elastizitätsmodul von PCS-Hydrogelen

3.3.2. Viskose Eigenschaften der PCS-Hydrosol

Eine weitere Form der mechanischen Charakterisierung ist die Bestimmung der dynamischen Viskosität der PCS-Lösungen. Die Scherviskosität ist eine für den Herstellungsprozeß relevante Größe.

Die Scherviskosität verschiedener PCS-Typen wurde in einem Rotationsviskosimeter bestimmt. Mit abnehmendem NCO/OH-Verhältnis stieg die Viskosität der PCS-Lösungen (Abbildung 3-20). Jedoch ist der Unterschied nicht gravierend. Mathematisch kann der Verlauf mit dem Modellansatz von Bingham beschrieben werden.

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot D \quad (\text{Gl. 3-2})$$

Die Schubspannung ist proportional zum Schergefälle. Es existiert aber eine Mindestschubspannung, in der Größe von einem Pa, die überwunden werden muß. Die Mindestschubspannung ist unabhängig vom eingesetzten PCS-Typ.

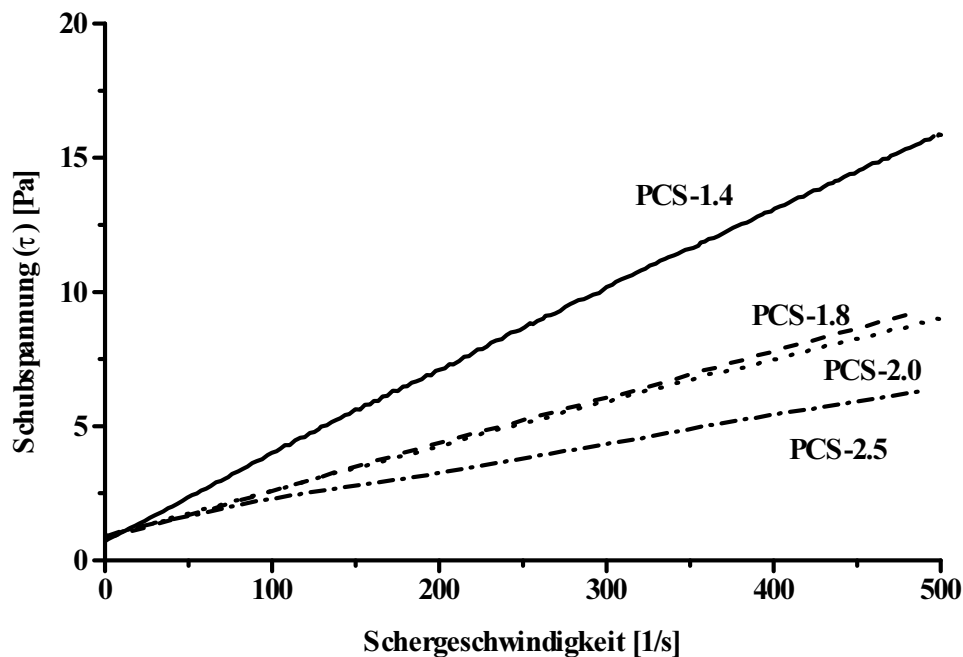


Abbildung 3-20 Schubspannungen in Abhängigkeit der Schergeschwindigkeit verschiedener PCS-Lösungen (Polymeranteil 10 %) bei 25°C und pH0 (Vermessung sofort nach Ansetzen der Lösung)

3.3.3. Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in PCS-Hydrogelen

Die entscheidende Größe für den Transport von Molekülen ist der effektive Diffusionskoeffizient. Der Diffusionskoeffizient wird mittels der in Kapitel 2.5 dargestellten Zweikammerapparatur gemessen. Um den Wert des Koeffizienten genau bestimmen zu können, mußte der Einfluß der externen Grenzschichten auf beiden Kammerseiten so weit wie möglich herabgesetzt werden. Dieses wurde durch ausreichendes Rühren der beiden Kammern gewährleistet. Die obere Kammer wurde mit einem mehrfach Balkenrührer vermischt. In der unteren Zelle sorgte ein magnetisches Rührstäbchen für die Vermischung. Abbildung 3-21 und Abbildung 3-22 zeigen den Einfluß der Rührerdrehzahl in den beiden Kammern auf den gemessenen effektiven Diffusionskoeffizienten von Nitrat (Natriumnitrat). Bei einer Rührerdrehzahl von über 700 Umdrehungen/min (U/min) in der unteren und über 200 U/min in der oberen Zelle blieb der Diffusionskoeffizient für Natriumnitrat konstant bei $1.5 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$.

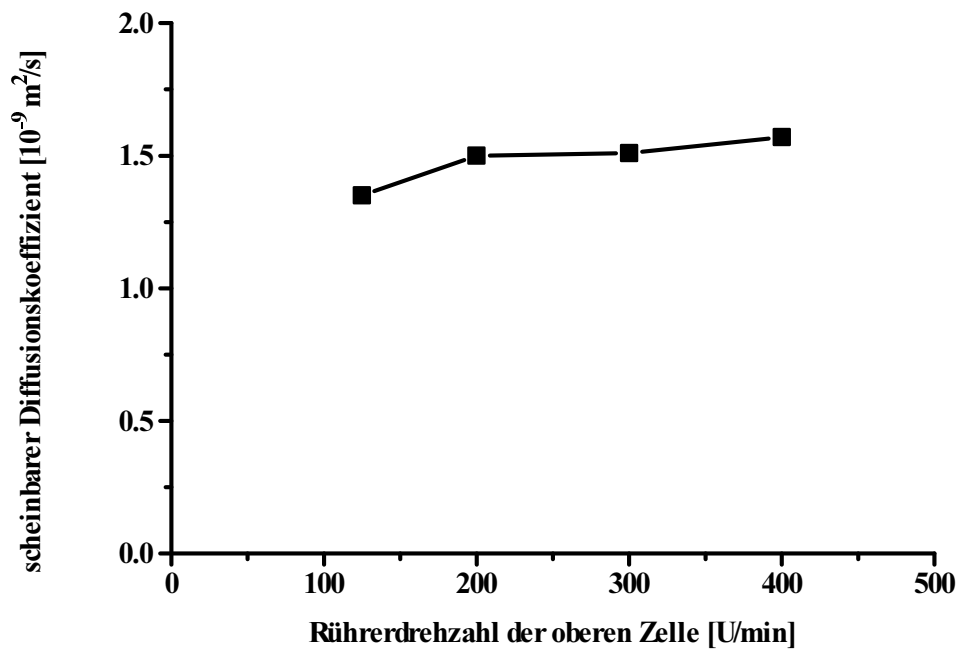


Abbildung 3-21 Scheinbarer Diffusionskoeffizient von Natriumnitrat in PCS-2.5 in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl der oberen Zelle

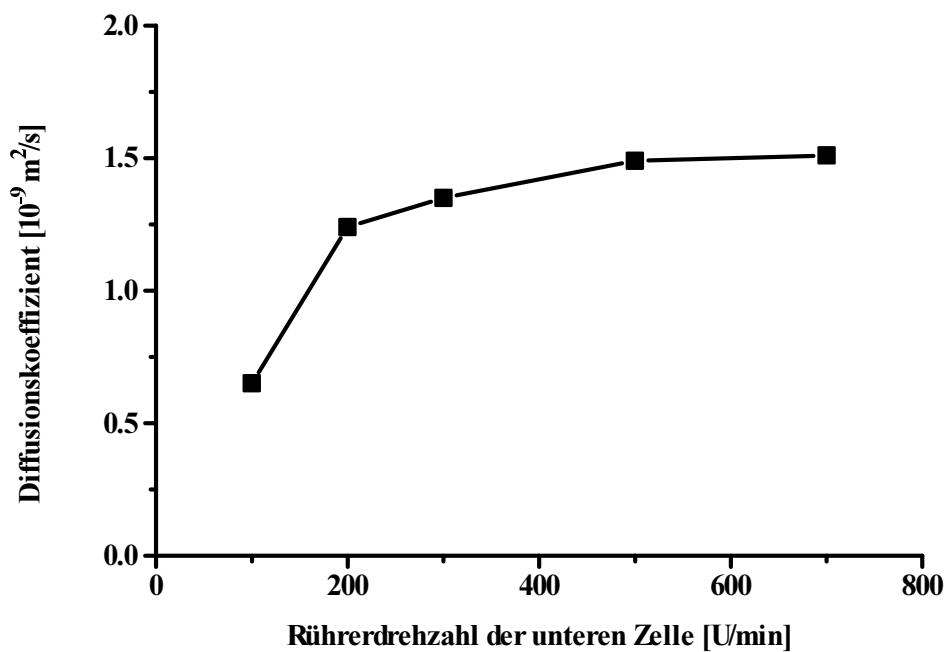


Abbildung 3-22 Scheinbarer Diffusionskoeffizient von Natriumnitrat in PCS-2.5 in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl der unteren Zelle

Mit der Drehzahl von 300 U/min in der oberen und 700 U/min in der unteren Zelle wurden Versuche mit verschiedenen anorganischen und organischen Molekülen durchgeführt. Tabelle 3-16 zeigt den Diffusionskoeffizienten für diese verschiedenen Substanzen in PCS-2.5-Hydrogelen. Das Verhältnis der gemessenen Werte zu den Werten in freier wässriger Lösung sank mit steigender Molekülgröße. Betrug er bei Glycerin (92 Da) 64 % des Wertes, so sank er bei Glukose (180 Da) auf 59 %.

Tabelle 3-16 Diffusionskoeffizienten verschiedener organischer und anorganischer Moleküle in PCS-2.5-Hydrogelen

Substanz	Molekulargewicht [Da]	$D_{\text{eff}} [10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}]$	$D_{\text{eff}}/D_0 [\%]$
Nitrat (Na-Salz)	62	15.8	72
Dihydroxyaceton	90	7.1	70
Glyzerin	92	6.43	64
Glukose	59	3.96	59

3.4. Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse

Die Anfangsaktivität nitrifizierender Bakterien bei der Einschlußimmobilisierung in PCS konnte gesteigert werden, wenn folgende Parameter beachtet wurden:

Das PCS mußte aus einem Präpolymer aufgebaut sein, dessen NCO/OH-Verhältnis möglichst niedrig war. Aktivkohle (z.B. die in den Versuchen verwendete Aktivkohle Hydrodarco C) diente der Adsorption toxischer Komponenten. Durch die Wahl geeigneter pH-Werte konnte die Kontaktzeit zwischen Bakterien und ausgießendem Hydrogel verkleinert werden, so daß insbesondere die Gruppe der Ammoniakoxidierer eine höhere Überlebensrate zeigte.

Die Optimierung dieser Parameter stieß jedoch an Grenzen. Das NCO/OH-Verhältnis konnte nicht weiter als auf den Wert 1,4:1 gesenkt werden, da die Stabilität der Hydrogele unterhalb dieses Wertes nicht mehr gewährleistet war. Die Zeitdauer der Gelierung konnte aus verfahrenstechnischen Gründen nicht zu weit gesenkt werden. Es mußte ausreichend Zeit bleiben, um die Biomasse mit dem PCS-Hydrosol zu vermischen und einen Formgebungsschritt einzuleiten. Verfahrenstechnisch gesehen, müßten pH-Wertanhebung und Biomassezugabe nacheinander direkt in den Hauptstrom des PCS-Hydrosols erfolgen.

Wie die Ergebnisse der Viskositätsmessungen verschiedener PCS-Typen zeigte, sind die Unterschiede relativ gering, so daß bei der Förderung eines PCS-Typs, der hinsichtlich seiner mechanischen Eigenschaften und seiner biologischen Verträglichkeit optimiert wurde, keine Probleme zu erwarten sind.

4. Poröse Adsorptionsträger auf Basis von Silikonkautschuk

Silikonkautschuk besteht aus langen quervernetzten Ketten mit einem Siliziumoxidrückgrat. Die Seitenketten setzen sich in der Regel aus Wasserstoff und aliphatischen oder aromatischen Kohlenstoffverbindungen. Silikonkautschuke sind chemisch sehr inert. Die Silikone vereinen durch die Molekülstruktur die chemischen Eigenschaften von Siliziumoxiden und Polymeren auf Basis von Kohlenwasserstoffen. Silikonkautschuk weist eine hohe Löslichkeit für Sauerstoff und gute Sauerstofftransporteigenschaften auf [74].

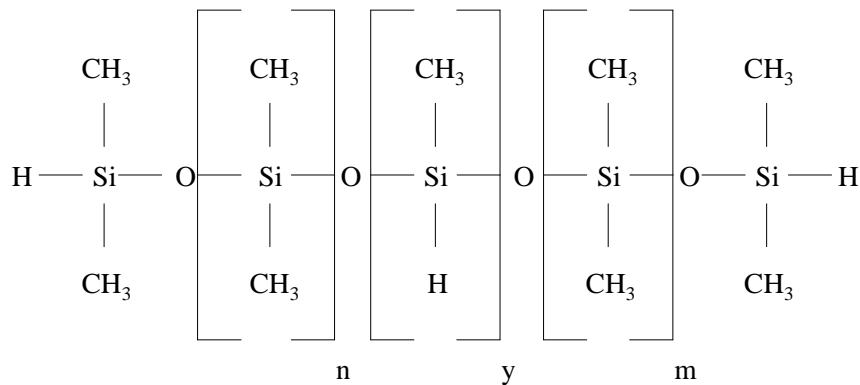


Abbildung 4-1 Strukturformel des Basispolymers

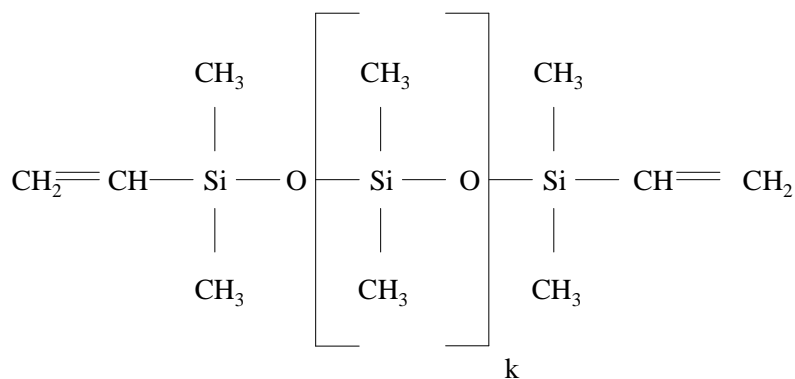


Abbildung 4-2 Strukturformel des Vernetzers

Das in dieser Arbeit verwendete Silikon ist ein raumtemperaturvernetzender Zwei-Komponenten-Flüssig-Silikon-Kautschuk (RTV-2 Silikon) der Bayer AG, welcher unter dem Handelsnamen Silopren vertrieben wird [75]. Der additionsvernetzende RTV-2-Kautschuk wird aus dem Basispolymer und dem Vernetzer aufgebaut. Dabei handelt es sich bei dem Basispolymer um ein durch Vinylgruppen endgestopptes, lineares Polydimethylsiloxan (Abbildung 4-1). Mit der Länge des Basispolymers nimmt die Viskosität des Silikonkautschuks zu.

Der Vernetzer ist ein Copolymer aus Mono- und Dimethylsiloxanen mit Silizium-Wasserstoff-Bindungen (Abbildung 4-2). Die Silizium-Wasserstoffbindungen reagieren unter dem Einfluß eines Platinkatalysators mit den Vinylgruppen des Basispolymers [76].

Für die Vernetzungsreaktion werden die Vinyl- (Vernetzer) und Wasserstoffgruppen (Basispolymer) in einem etwa äquimolaren Verhältnis eingesetzt. Dadurch ergibt sich ein Mischungsverhältnis von 94 % Silopren U1 (Polydimethylsiloxan) und 6 % Silopren U Vernetzer 260 (Vernetzer). Der Katalysator wird dem Gemisch in der Größenordnung von 0,1 % zugesetzt.

4.1. Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung poröser Silikon-Adsorber

Poröse Träger auf Basis von Silikon werden nach folgendem Grundprinzip hergestellt: Einem RTV-2 Silikongemisch wird vor der Vernetzung Natriumchlorid zugesetzt. Das Natriumchlorid löst sich nicht im flüssigen Silikon, sondern wird mit diesem nur vermengt. Nach dem Aushärten des Kunststoffs wird das Kochsalz mit Wasser aus dem Träger gelöst und hinterläßt ein verbundenes Hohlraumsystem. Die Verbindungskanäle entstehen durch Kontaktpunkte und -flächen zwischen den Partikeln sowie durch das Aufplatzen von abgeschlossenen Salzkavernen. Das Aufplatzen läßt sich folgendermaßen erklären:

Da Silikon undurchlässig für flüssiges Wasser, jedoch begrenzt durchlässig für Wasserdampf ist, steigt der Innendruck als Folge des osmotischen Drucks des sich lösenden Kochsalzes an, bis der dünne Silikonfilm einreißt. Die Verbindungskanäle sind dadurch in ihrer Größe naturgemäß recht unterschiedlich. Das gilt um so mehr, da sich die Einrißkanäle nach der Druckentspannung wahrscheinlich wieder verschließen können.

Kugelförmige Träger auf Basis von porösem Silikon können nach dem Emulsionsverfahren hergestellt werden. Das Porenvolumen erreicht bei diesem Verfahren ca. 70 Vol. % [38] (siehe Kapitel 2.3.2.2). Ein Nachteil dieser so hergestellten Silikonpartikel ist jedoch ihr Dichteunterschied zum Wasser. Die relativ kleine Differenz führt zu geringen Relativbewegungen der Partikel zum Fluid. Die Folge ist eine externe Diffusionslimitierung. Um diesen Umstand zu verbessern, muß die Dichte der Träger erhöht werden.

Ein Additiv, das geeignet ist, die Dichte der porösen Silikonträger zu erhöhen, darf bei einer möglichen Freisetzung aus der Silikonmatrix keinerlei negative Effekte auf Mikroorganismen ausüben. Als Mittel der Wahl bietet sich daher Titandioxid (TiO_2) an. Titandioxid ist ein weißes, sehr feines Pulver, welches hauptsächlich als Farbpigment, z.B. in Kreide oder Zahnpasta eingesetzt wird. Da es sich in hohem Maße inert verhält, ist es sehr gut geeignet, um als Additiv in einem Immobilisationsträger eingesetzt zu werden. Sein besonderer Vorteil liegt in der hohen Dichte von 4200 kg/m^3 . Dieser Wert liegt deutlich über dem des Siliziumdioxids, einem ebenfalls sehr inertem Additiv, daß in der Silikonkautschukindustrie als Stabilisator eingesetzt wird [74], [77], [78].

Das Emulsionsverfahren kann derzeit nicht in einem größeren Maßstab angewandt werden. Problematisch ist einerseits die weite Streuung der Partikelgrößen, außerdem muß das Suspensionsmedium von den Partikeln abgetrennt und entsorgt werden.

Ein Verfahren mit einer portionierten Verteilung der pastösen Masse könnte dem Abhilfe schaffen. Versuche zeigten, daß der Einsatz einer Exenterschneckenpumpe oder die Förderung mit Luftdruck die Herstellung eines Vollstrangs des Silikon-Kochsalz Gemisches in definierter und gleichmäßiger Stärke erlaubte. Der Kochsalzanteil im Gemisch mußte hierzu jedoch reduziert werden, da die Masse sonst nicht förderfähig ist und zur Phasentrennung neigt [79].

Der Vollstrang konnte auf erhitztem Kochsalz aufgefangen werden. Nach der Aushärtung wurden die Stränge gleichmäßig geschnitten. Das Resultat waren zylinderförmige Partikel.

Um kugelförmige Partikel zu erhalten, wurde der Vollstrang nach dem Austritt aus der Förderdüse durch einen beweglichen Draht geschnitten. Die Partikel fielen in einen Dragierkessel, der zu 10 Vol. % mit Kochsalz gefüllt war und auf 90°C beheizt wurde (Abbildung 2-2).

Die Partikel rundeten sich durch Rollbewegung auf dem Salz ab und härteten aus. Abbildung 4-3 zeigt den Querschnitt eines noch mit Salz bestückten Partikels. Neben den bei der Förderung im Silikon befindlichen Salzkristallen wurden durch das Rollen Salzkristalle in die weiche Oberfläche gedrückt. Anschließend konnte das Natriumchlorid aus dem Träger gewaschen werden (Kapitel 2.3.2.3). Die Salzkristalle hinterließen ein Porensystem in der Silikonmatrix (Abbildung 4-4).

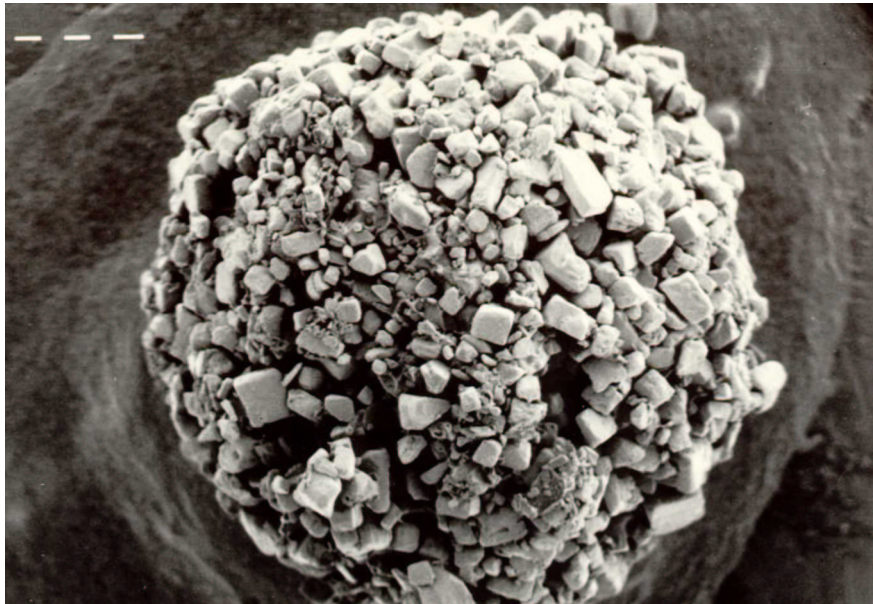


Abbildung 4-3 Oberfläche eines Silikonadsorbers nach der Herstellung und vor dem Auswaschen des Salzes (REM; rechter Balken entspricht 100 µm) [79]

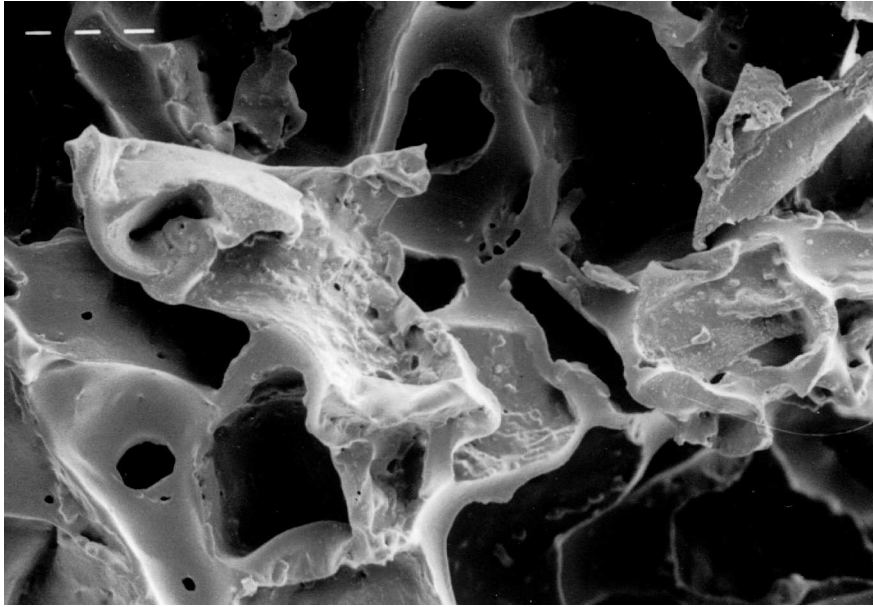


Abbildung 4-4 Poren im Querschnitt eines vom Salz befreiten Silikonadsorbers (REM; rechter Balken entspricht 10 μm) [79]

Da Salzkristalle des Auffangmediums zusätzlich durch mechanische Kräfte in den Träger gedrückt wurden, stieg die Porosität des Trägers von den berechneten 45 % auf ca. 70 %. Gleichzeitig sank die Gesamtdichte der Träger von den berechneten 1100 kg/m^3 auf 1050 kg/m^3 [79].

Die Partikelgrößenverteilung war sehr eng. Der größte Teil der Partikelmasse hatte einen Durchmesser zwischen 1,8 und 2,0 μm (Abbildung 4-5). Dieses war etwas größer als der Düsenaustrittsquerschnitt von 1,5 mm. Da die Silikonmasse während der Förderung zu vernetzen begann, wurden in der sich verengenden Düse Normalspannungskräfte aufgebaut, die nach dem Austritt wieder abgebaut wurden und zu einer Aufweitung des Materials führten [77].

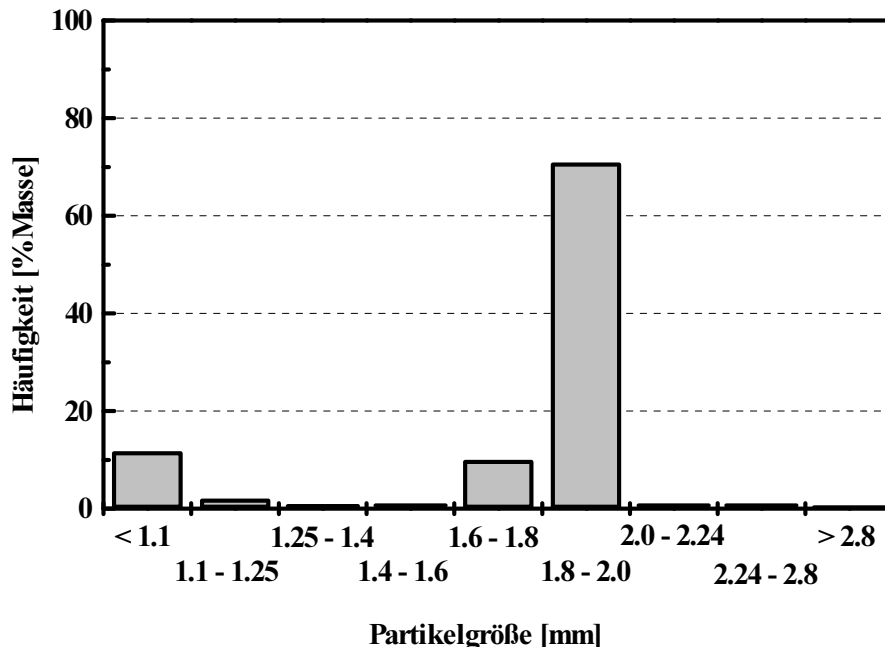


Abbildung 4-5 Partikelgrößenverteilung (Extrusionsverfahren) [79]

4.2. Immobilisierung von Nitrifikanten

Wichtige Entscheidungskriterien für einen Träger immobilisierter Biomasse sind das Aufwuchsverhalten sowie die maximale Aktivität der Immobilisate. Dazu waren Versuche notwendig, durch die eine Vielzahl von unterschiedlichen Adsorbern miteinander verglichen werden konnten. Der ideale Fall ist der Vergleich der Immobilisate in kontinuierlich betriebenen Reaktoren. Hier ändert sich die Konzentration von Edukten und Produkten nur über einen längeren Zeitraum. Die Änderung ist analog zum veränderten Bewuchs und zur veränderten Aktivität der Träger. Der Nachteil liegt im Problem der Handhabung. Die Wachstumsrate von Nitrifikanten ist relativ gering, so daß zum vollständigen Bewuchs der Adsorber mehrere Wochen vergehen können. Zudem ist die Zahl der parallel zu betreibenden Reaktoren für eine praktische Versuchsdurchführung zu groß. Eine Alternative bietet daher die Möglichkeit von diskontinuierlichen Reaktoren in Form von Schüttelkolbenkulturen. Diese Kulturen werden täglich mit neuem Medium befüllt, wobei die Immobilisate zurückgeführt werden. Die Anzahl der Immobilisatperlen wird dabei so gewählt, daß der Anteil von umgesetztem Edukt gering ist. Dadurch erhält man gleichbleibende Bedingungen, wie sie in kontinuierlich betriebenen Reaktoren anzutreffen sind. Bei den verwendeten Adsorptionsimmobilisaten handelte es sich um poröse Silikonträger und um poröses Glas. Das poröse Glas wurde eingesetzt, um die Aktivität der SI-Adsorber mit einem Träger zu

vergleichen, dessen Matrix nicht für Sauerstoff durchlässig ist. Die SI-Adsorber unterschieden sich sowohl in ihrer Porengröße und Porengrößenverteilung als auch in der Verwendung und Nichtverwendung von Titandioxid als Additiv zur Dichteerhöhung. Tabelle 4-1 und Tabelle 4-2 geben einen genauen Überblick über die eingesetzten Träger und ihre Unterscheidungsmerkmale.

Tabelle 4-1 Kenndaten poröser Glasträger

Typbezeichnung	Material	Porengröße	Porenvolumen [Vol. %]
Glas-1	Siranglas	< 120 µm	60
Glas-2	Siranglas	< 300 µm	60

Tabelle 4-2 Kenndaten poröser Silikonträger

Typbezeichnung	Herstellungsverfahren	Titandioxid	Porengröße	Porenvol. [Vol. %]
SI-EV-1	Emulsionsverfahren (Kapitel 2.3.2.2)	Nein	100-200	65
SI-EV-2	Emulsionsverfahren (Kapitel 2.3.2.2)	Ja	100-200	65
SI-SV-1	Strahlschneidverfahren (Kapitel 2.3.2.1)	Nein	< 600	70
SI-SV-2	Strahlschneidverfahren (Kapitel 2.3.2.1)	Nein	200-300	70
SI-SV-3	Strahlschneidverfahren (Kapitel 2.3.2.1)	Nein	< 100	70
SI-SV-4	Strahlschneidverfahren (Kapitel 2.3.2.1)	Nein	80 Vol. % 100-200 µm 20 Vol. % < 100 µm	70

Abbildung 4-6 zeigt den Verlauf der Nitratbildung von Nitritoxidierern auf verschiedenen Silikonadsorbern über einen Zeitraum von ca. 1100 h. Die Adsorber besaßen den gleichen Partikeldurchmesser (1,0 bis 1,1 mm), unterschieden sich aber in der Porengröße. Zwei der eingesetzten Adsorbertypen hatten eine relativ enge Porengrößenverteilung (> 600 µm mit der Bezeichnung SI-SV-1 bzw. 200 bis 300 µm mit der Bezeichnung SI-SV-2). Der dritte Adsorbertyp wies dagegen eine weite Porengrößenverteilung auf. Es entfielen 20 % des

Porenvolumens auf Poren mit einem Radius unter 100 μm . 80 % des Porenvolumens entfielen auf Poren mit einem Radius von 100 bis 200 μm (Typ SI-SV-4).

Nitritoxidierer auf Adsorbern mit der weiten Partikelgrößenverteilung (SI-SV-4) sowie auf Adsorbern mit ausschließlich sehr großen Poren (SI-SV-1) besaßen am Ende der Versuchsreihe nach ca. 1100 Stunden die größte Aktivität ($>20 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$ Adsorber und 15 bis $20 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$ Adsorber). Bakterien auf einem Adsorber mit enger Porengrößenverteilung im mittleren Größenbereich (SI-SV-2) lagen mit ihrer Endaktivität von ungefähr $10 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{ml}$ Adsorber hinter den beiden anderen Adsorbertypen zurück.

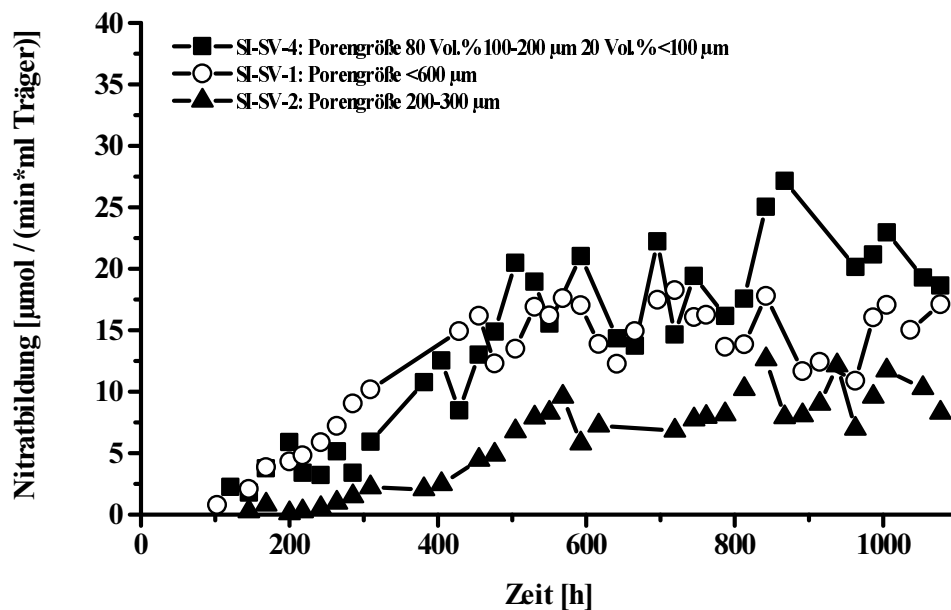


Abbildung 4-6 Aktivität von Nitritoxidierer auf Silikonen mit unterschiedlichen Porengrößen (I) (Kultivierung bei 30°C mit täglichem Mediumswechsel; 10 mM Nitrit)

Vergleicht man den Träger SI-SV-4 mit einem weiteren Träger, der eine homogene Porengrößenverteilung aber eine geringe Porengröße aufweist (SI-SV-3), so zeigen sich kaum Aktivitätsunterschiede. Nitritoxidierer auf beiden Adsorbern erreichten annähernd dasselbe Endniveau und wichen auch im gesamten zeitlichen Verlauf kaum voneinander ab (siehe Abbildung 4-7).

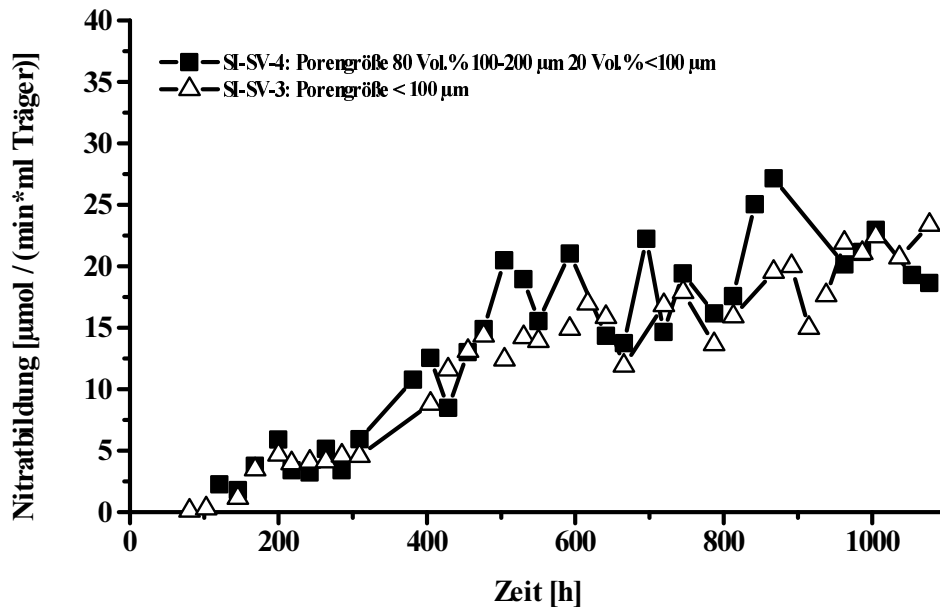


Abbildung 4-7 Aktivität von Nitritoxidierern auf Silikonem mit unterschiedlichen Porengrößen (II) (Kultivierung bei 30°C mit täglichem Mediumswechsel; 10 mM Nitrit)

Begründen lassen sich diese Ergebnisse mit den Besonderheiten der Herstellung der Silikonadsorber. Die Adsorber wurden in Kochsalz aufgefangen. Vor der Vernetzung drangen die Salzpartikel in die noch weiche Matrix der Silikonkörper ein. Zum einen erhöhte sich dadurch das vorausberechnete Porenvolumen, zum anderen veränderten diese Fremdkörper die Porengrößenverteilung. Da die Hauptmasse der externen Salzkörner eine Größe von 200 bis 300 µm hatte, wurde die Partikelgrößenverteilung in allen Ansätzen außer der Charge mit 200 bis 300 µm Ausgangsgröße (SI-SV-2) verändert. Dies bedeutet, daß hauptsächlich die Mischung aus größeren und kleineren Poren die Aktivität des Trägers positiv beeinflusst.

Daß die Größe der Poren eines Adsorbers Einfluß auf den Bewuchs durch Nitritoxidierer und damit auf deren Aktivität haben kann, läßt sich am Beispiel des porösen Glases zeigen. Eine Porengröße von ca. 120 µm (Glas-1) führte zu einer fast doppelt so hohen Nitratabbildungsrate wie die eines Adsorbers mit einer Porengröße von 300 µm (Glas-2), dessen Maximalaktivität kaum mehr als 5 µmol/min*ml Adsorber betrug (Abbildung 4-8).

Der Grund dafür kann darin liegen, daß die externen Scherkräfte in den größeren Poren viel tiefer einwirken und somit den Biofilm stärker abscheren konnten. Da der größte Teil der Biomasse im oberflächennahen Bereich angesiedelt war, führte die ständige Scherkräfteinwirkung zu der geringeren Endaktivität.

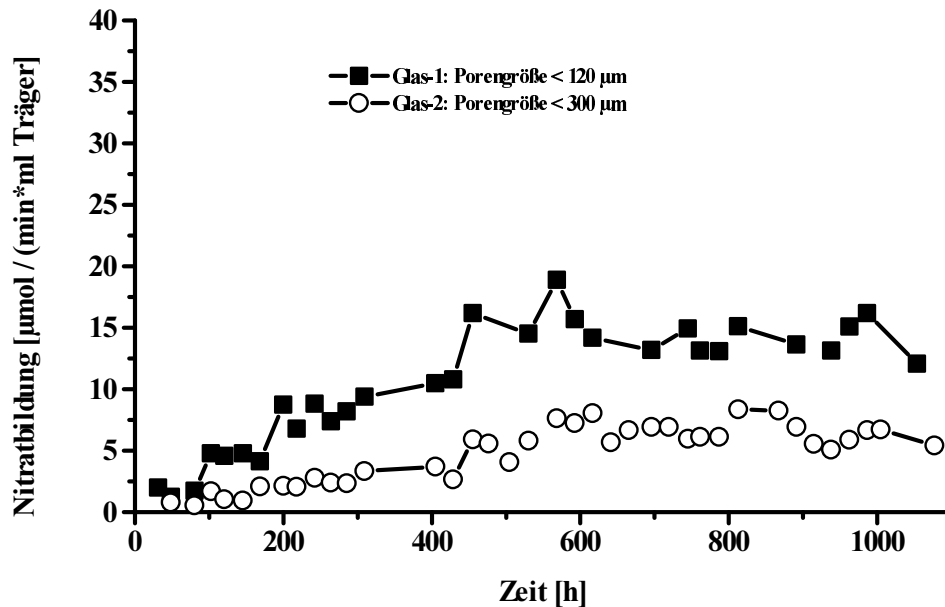


Abbildung 4-8 Aktivität von Nitritoxidierer auf Glas mit unterschiedlichen Porengrößen (Kultivierung bei 30°C mit täglichem Mediumswechsel; 10mM Nitrit)

Titandioxid verringert die Oberflächenspannung des Silikonkautschuks (siehe auch Kapitel 4.3). Um zu zeigen, daß die Bakterien auf einer hydrophileren Oberfläche besser aufwachsen, wurden Versuche mit titandioxidhaltigen (SI-EV-2) und titandioxidfreien Silikonadsorbern (SI-EV-1) durchgeführt, die in beiden Fällen nach dem Emulsionsverfahren hergestellt wurden.

Der Aufwuchs von Nitritoxidierern auf titandioxidhaltigen Trägern erfolgte wesentlich schneller als auf reinen Silikonträgern. Auch der Endwert der bakteriellen Aktivität lag um 5 bis 10 µmol/min*ml Adsorber wesentlich höher. Dieses Ergebnis kann auf die oben geschilderte erhöhte Hydrophilie zurückgeführt werden (Abbildung 4-9).

Es muß allerdings auch in Betracht gezogen werden, daß Titandioxid die Gesamtdichte der Adsorber erhöht. Eine höhere Dichte führt zu einer höheren Relativgeschwindigkeit zum Umgebungsmedium und somit zu einem verbesserten Stoffübergang vom Fluid zum Festkörper [80]. Die auf dem SI-EV-2-Träger angesiedelten Bakterien könnten also ihre verbesserte Substratversorgung zu einer höheren Aktivität entfalten. Welcher dieser beiden Faktoren die ausschlaggebende Rolle spielt, ist nicht genau zu bestimmen. Es ist jedoch deutlich, daß (makroskopisch betrachtet) der schwere SI-EV-2-Träger schneller und effektiver besiedelt wurde.

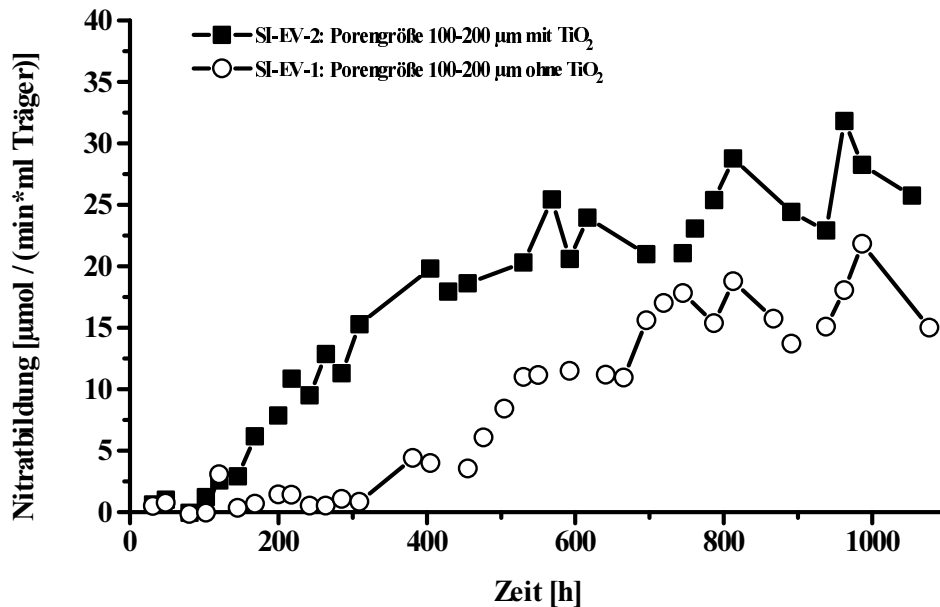


Abbildung 4-9 Aktivität von Nitritoxidierern auf porösen Silikonen mit und ohne Titandioxid (Kultivierung bei 30°C mit täglichem Mediumswechsel; 10mM Nitrit)

Der Vergleich des SI-EV-2-Adsorbers mit porösem Glas (Glas-1) zeigte, daß immobilisierte Nitritoxidierer auf Silikon eine wesentliche höhere Aktivität aufwiesen als auf porösem Glas. Die Endaktivität der Nitritoxidierer erreichte auf den Glasträgern ca. 15 µmol/min * ml Adsorber. Das entspricht ungefähr der Hälfte der Aktivität, die (am Ende der Versuche) auf dem SI-EV-2-Adsorbern nachgewiesen werden konnten (Abbildung 4-10). Neben den oben genannten Effekten der Porengröße und der Porengrößenverteilung kam hier vermutlich der verbesserte Sauerstofftransport durch die Silikonmatrix zum Tragen.

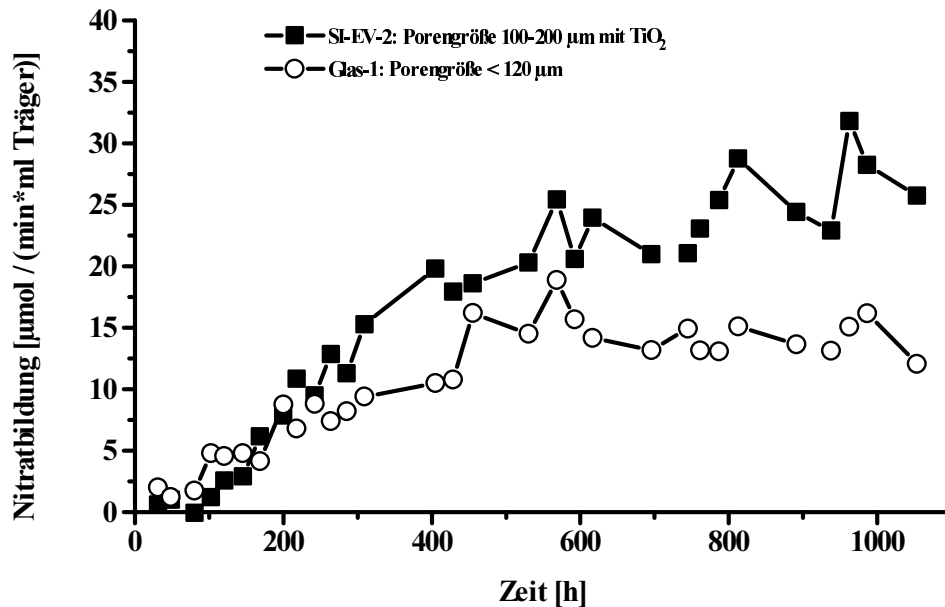


Abbildung 4-10 Vergleich der Aktivität von Nitritoxidierern auf porösem Glas und porösem Silikon (Kultivierung bei 30°C mit täglichem Mediumswechsel; 10mM Nitrit)

Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12 zeigen Oberfläche und Querschnitt von schweren Silikonadsorbern nach der Langzeitkultivierung. Die Biomasse auf den Trägern war mit einer Iodonitrotetrazoleumchlorid-Lösung (INT) rot gefärbt worden, um den Kontrast zwischen Biomasse und Trägermaterial zu erhöhen. Die Nitritoxidierer siedelten sich bevorzugt in den Poren der Silikonträger an. REM-Aufnahmen von Bakterien belegen, wie sie schichtförmig auf der Oberfläche von Poren wachsen (Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14).

Die verbleibende Außenoberfläche war nahezu frei von Mikroorganismen. Vermutlich sorgten die Scherkräfte im Bioreaktor dafür, daß sich kein geschlossener Biofilm auf den exponierten Flächen ausbilden bildete. Durch diesen Effekt konnten die Silikonadsorber ihre positiven Eigenschaften voll entfalten. Der Sauerstoff gelangte nun aus dem Fluid durch einen laminaren Grenzfilm direkt in die Silikonmatrix. Dank des hohen Permeationskoeffizienten für Sauerstoff in Silikon wurden nun auch tiefer in den Poren liegende Bakterien-schichten mit Sauerstoff versorgt.

Ein Bakterienfilm auf der äußeren Oberfläche hätte als Diffusionsbarriere wirken. Bei Glasadsorbern bringt die freie Oberfläche keinerlei Vorteil für die Versorgung der Zellen, da Glas für Sauerstoff nahezu undurchlässig ist.

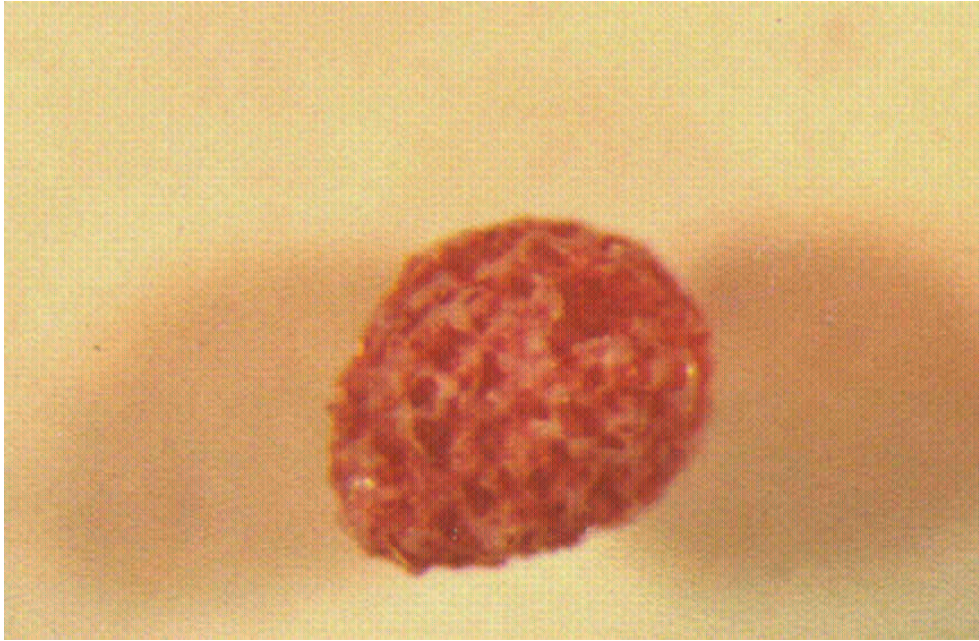


Abbildung 4-11 Adsorbierte Nitritoxidierer auf der Oberfläche eines titandioxidhaltigen porösen Silikonträgers nach mehrwöchiger Kultivierungszeit (Anfärbung der Bakterien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT-Chlorid); Ø ca. 1 mm)

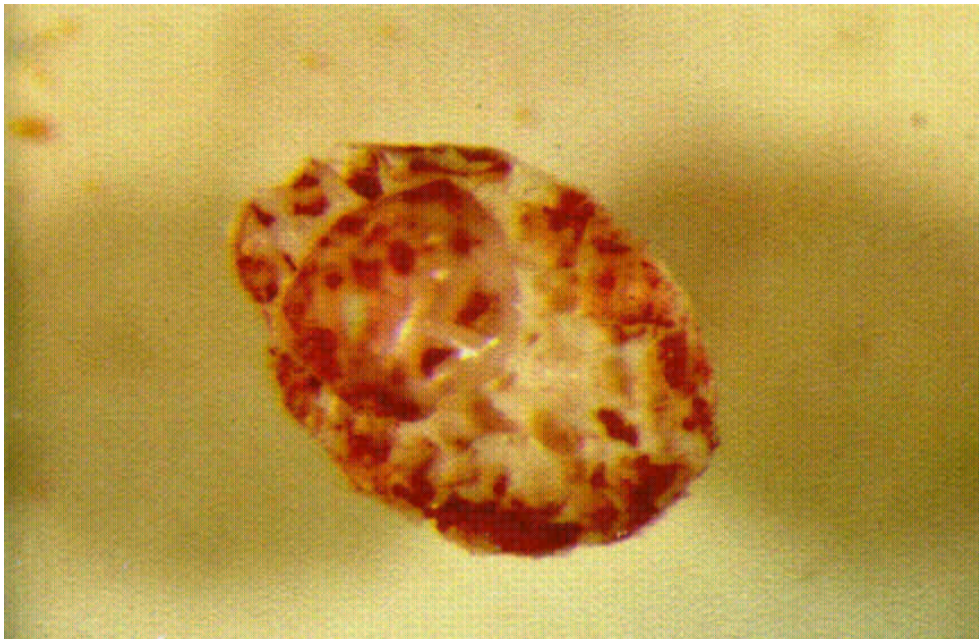


Abbildung 4-12 Adsorbierte Nitritoxidierer im Querschnitt eines titandioxidhaltigen porösen Silikonträgers nach mehrwöchiger Kultivierungszeit (Anfärbung der Bakterien mit Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT-Chlorid); Ø ca. 1 mm)

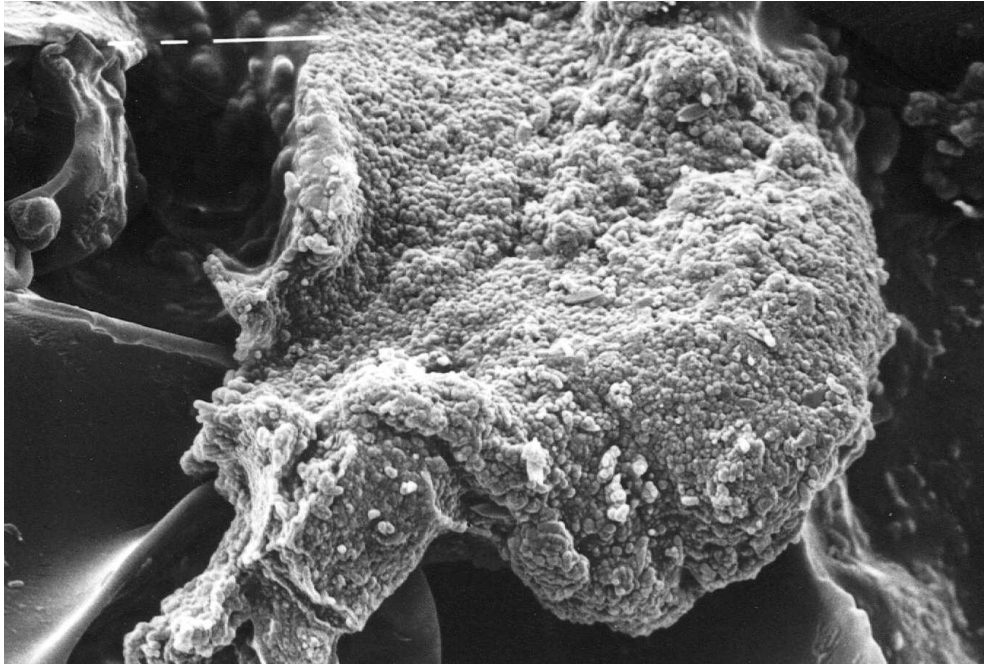


Abbildung 4-13 Nitrifikanten in den Poren eines Silikonadsorbers (REM; rechter Balken entspricht 10 μm)

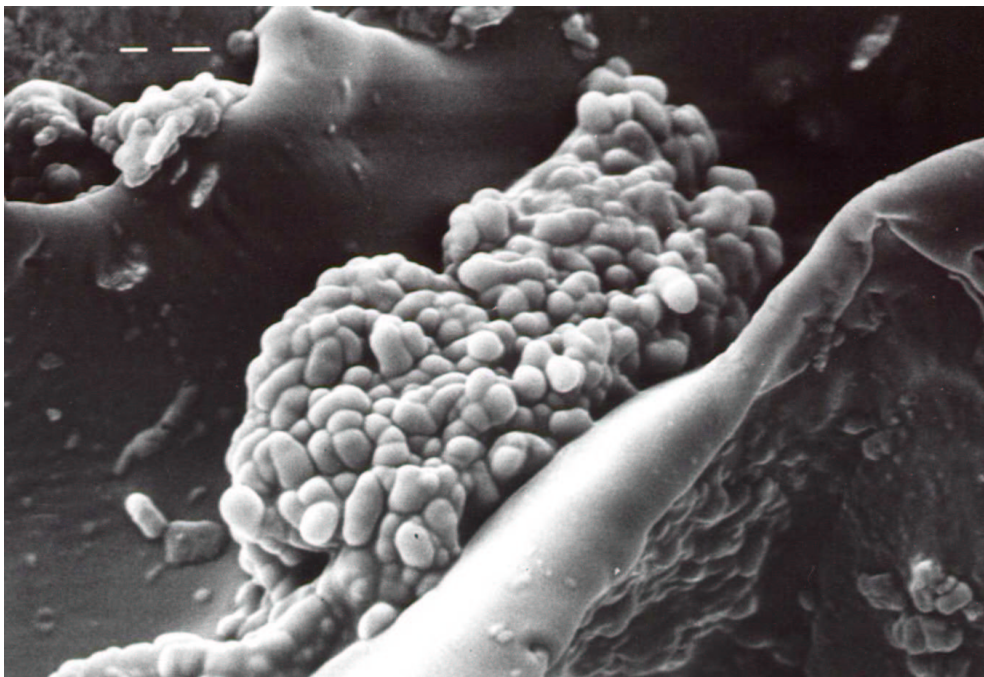


Abbildung 4-14 Nitrifikanten in den Poren eines Silikonadsorbers (REM; rechter Balken entspricht 1 μm)

4.3. Mechanische und physikalische Charakterisierung

4.3.1. Mechanische Stabilität von Silikonformkörpern

Die mechanische Charakterisierung erfolgte nach DIN53504 [55]. Die Messungen wurden am Institut für Baustoffe, Massivbau und Brandschutz der TU-Braunschweig durchgeführt. Interessant war dabei die Frage, welchen Einfluß das Additiv Titandioxid auf das Stabilitätsverhalten der Silikonformkörper hat. Tabelle 4-3 zeigt das E-Modul, die Reißfestigkeit und Reißdehnung von Silikonmembranen mit verschiedenen Titandioxiden. Die eingesetzten Titandioxid-Typen (2073, 2210 und 2220) unterscheiden sich darin, daß die Oberfläche der Einzelpartikel mit verschiedenen Polymeren beschichtet sind. Die Beschichtung könnte einen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen Partikel und Silikonkautschuk haben.

Es zeigte sich, daß die Titandioxide die Festigkeit des Silikonkautschuks positiv beeinflussten. Der Einfluß auf die Reißfestigkeit des Silikons war allerdings gering. Der Reiß des Formkörpers mit den besten Eigenschaften (einem Silikonkautschuk mit dem Titandioxid-Typ 2073) erfolgte bei fast 80 % Dehnung und einer Reißfestigkeit nahe 0,25 MPa.

Tabelle 4-3 Mechanische Parameter verschieden bezuschlagter Silikonkautschuke (50 Vol. % Porösität; 3,125 Vol. % Titandioxid)

Material	E-Modul [MPa]	Reißfestigkeit [MPa]	Reißdehnung [%]
Silikon	0,26	0,17	65
Silikon mit TiO ₂ 2073	0,29	0,23	79
Silikon mit TiO ₂ 2210	0,29	0,20	70
Silikon mit TiO ₂ 2220	0,22	0,17	77

4.3.2. Rheologische Eigenschaften der Silikon/Salzmischungen

Für die Herstellung von porösen Silikonadsorbern nach dem Schneideverfahren muß das Gemisch aus unvernetztem Silikon und Kochsalz mittels Druck durch eine Düse gefördert werden.

Um die Zusammensetzung der Mischung in Hinblick auf die Förderung zu optimieren, wurden die rheologischen Stoffwerte des Extrudats mit einem Viskosimeter bestimmt. Das Feststoff-Flüssigkeitsgemisch tendierte unter Einwirkung von Scherkräften zur Phasentrennung. Erst bei einem Volumenanteil von unter 50 % Salz war das Gemisch gleichmäßig fließfähig. Das Fließverhalten war neben dem Salzgehalt auch von der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung des Salzes abhängig. Der Gebrauch von feineren Salzpartikeln (50 bis 100 µm) führt zu deutlich höheren Viskositäten als mit gröberen Körnern (100 bis 200 µm). In beiden Fällen stieg die Viskosität im Bereich von 40 bis 50 Vol. %-Anteil Salz exponentiell mit dem Salzgehalt an (Abbildung 4-15).

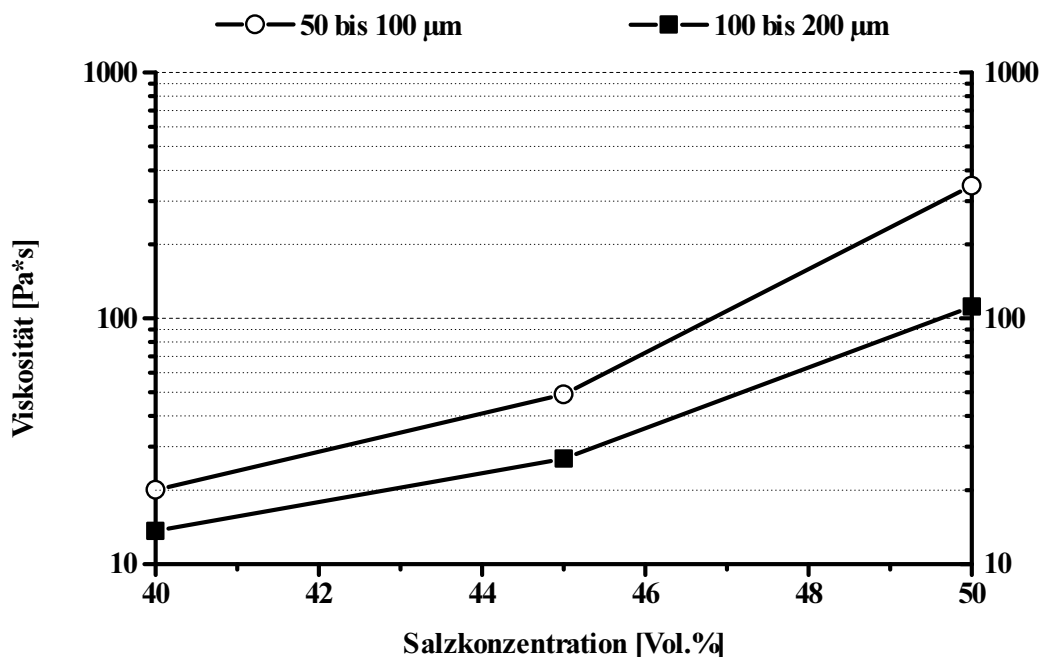


Abbildung 4-15 Abhängigkeit der Viskosität von der Konzentration und der Partikelgröße des Salzes in einem Silikon/Salzgemisch [81]

Das Fließverhalten von Feststoff/Silikonsuspensionen ist nicht linear und hat viskoelastischen Charakter, daher bedarf es bei einer Maßstabsvergrößerung einer Extrusionsapparatur einer genauen Untersuchung der Fließfähigkeit der Mischung [73].

4.3.3. Oberflächeneigenschaften von Silikonformkörpern

Titandioxid hat neben der Dichteerhöhung noch einen weiteren Vorteil:

Durch Zumischung von Titandioxid zum Silikonkautschuk verändern sich die Oberflächeneigenschaften der Matrix. Wie Tabelle 4-4 zeigt, sank der Kontaktwinkel von Wasser auf der Oberfläche der Formkörper um über 10°. Den kleinsten Kontaktwinkel zwischen Wasser und Silikon hatte ein Kautschuk mit Titandioxid 2210 als Additiv.

Die hydrophilere Oberfläche bewirkt, daß sich Bakterien leichter ansiedeln können (siehe dazu Kapitel 4.2). Zudem werden die mit Titandioxid versehenen Träger leichter vom Wasser benetzt und zeigen darum eine geringere Neigung aufzuschwimmen.

Tabelle 4-4 Kontaktwinkel Wasser/Silikon

Additiv	Kontaktwinkel Wasser/Silikonoberfläche
ohne Additiv	103.75°
Titandioxid Typ 2073	97°
Titandioxid Typ 2210	93°
Titandioxid Typ 2220	95°

4.3.4. Bestimmung der Diffusionseigenschaften

Zur Charakterisierung der inneren Struktur der Silikon-Adsorber wurde der Labyrinthfaktor bestimmt. Der Labyrinthfaktor ist der Quotient aus der freien Diffusion und der effektiven Diffusion in einem porösen Körper [82], [83].

$$L = P * \frac{D}{D_{eff}} \quad (\text{Gl. 4-1})$$

Er ist ein Maß für den geometrischen Aufbau des Porensystems in einem Träger. Große Labyrinthfaktoren können dabei unterschiedliche Aussagen bezüglich der Struktur zulassen. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß der Porenweg bei gleichbleibendem Querschnitt nicht geradlinig in den Träger führt, zum anderen kann trotz Einhaltung einer radialen Richtung der Querschnitt der Poren so klein werden, daß insgesamt betrachtet der effektive Diffusionskoeffizient stark verringert ist. Der erste Fall bedeutet, daß der Träger rein mechanisch von Bakterienzellen besiedelt werden kann. Im zweiten Fall könnte die Querschnittsverringering zu einer räumlich Behinderung des Bakterienwachstums führen.

Der Labyrinthfaktor für poröses Silikon wurde berechnet aus dem Quotienten des effektiven Diffusionskoeffizienten von Natriumnitrat durch ein Hydrogel (PCS) und einem porösen Silikonformkörper, dessen Poren mit PCS ausgefüllt waren. Die Diffusionskoeffizienten wurden mit der in Kapitel 2.5.2 dargestellten Apparatur bestimmt. Der Labyrinthfaktor hat für einen Silikon-Adsorber mit 65 Vol. % Poren einen Wert von 2,9.

Bei der Auswertung der Natriumnitratwanderung durch eine poröse Silikonmembran wurde die sogenannte time-lag Methode angewandt. Dabei wurde nicht der effektive Stofffluß als Maß für die Diffusionsgeschwindigkeit angenommen, sondern es wurde mit Hilfe der Meßergebnisse auf den Durchbruchpunkt interpoliert. Der Grund für diese Vorgehensweise liegt darin, daß es sich bei den Silikonmembranen nicht um homogene Strukturen handelt. Die Herstellung der Membran bedingt ein Porensystem, daß von der Oberfläche zur Mitte des Formkörpers führt. Die beiden Seiten der Membran beinhalten also zwei unabhängige Porensysteme, die nicht unbedingt überall miteinander verbunden sind. Die time-lag-Methode ist unabhängig vom Gesamtfluß der Membran und benötigt nur den zeitlichen Verlauf der gemessenen Nitratkonzentration.

Der Permeationskoeffizient für Sauerstoff ist das Produkt aus Diffusionskoeffizient und der Löslichkeit von Sauerstoff in dem zu betrachtenden Material [84]. Titandioxide bilden sterische Hindernisse beim Sauerstoffdurchgang durch eine Silikonkautschukmembran. Da sie auch die mechanische Stabilität beeinflussen, stellt sich die Frage, inwiefern auch der Sauerstoffpermeationskoeffizient beeinflusst wird. Hierzu wurden unporöse Silikonmembranen mit und ohne Titandioxid hergestellt. Diese Membranen wurden mit der in Kapitel 2.5.2 dargestellten Methode vermessen.

Titandioxid beeinflusste den Sauerstoffpermeationskoeffizient in Silikon nur geringfügig. Den kleinsten Wert besaß der Silikonkautschuk mit Titandioxid 2210 als Additiv (Abbildung 4-16).

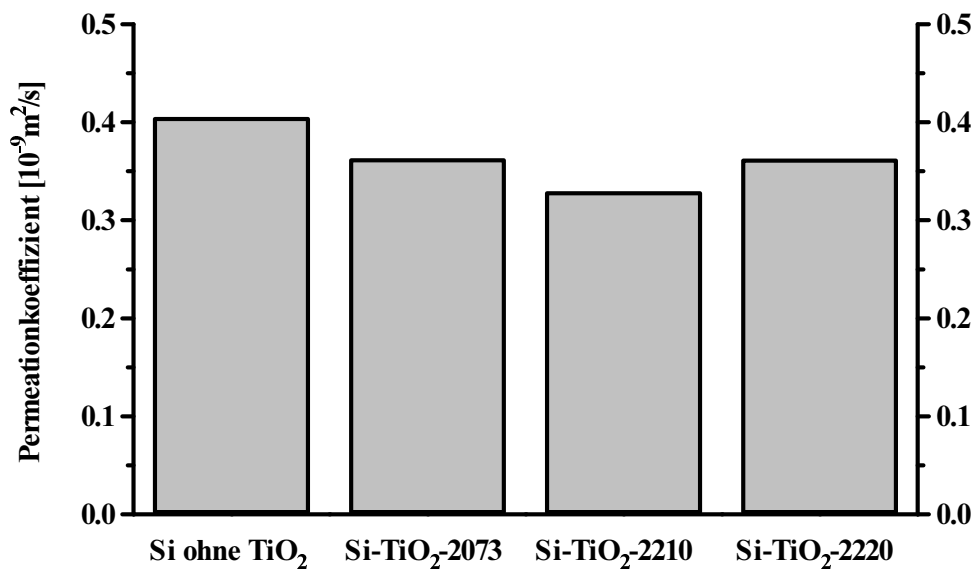


Abbildung 4-16 Sauerstoffpermeationskoeffizient in Silikonkautschuk mit unterschiedlichen Titandioxid-Typen

4.4. Diskussion der Ergebnisse

Bakterien der Gruppe der Nitritoxidierer adsorbieren auf porösen Silikonträgern. Ihre Aktivität ist nach einer längeren Wachstumsphase deutlich höher als bei Glasadsorbern gleichen Durchmessers. Dieses gilt insbesondere dann, wenn den Silikonträgern bei der Herstellung Titandioxid beigefügt wurde.

Titandioxid erhöht die Dichte des Trägers. Rechnerisch wurde ein Wert von 1100 kg/m^3 bei einer Porosität von 45 Vol. % ermittelt. Da jedoch der noch nicht vernetzte Silikonkautschuk in einem mit Kochsalz gefülltem Dragierkessel aufgefangen wurde, konnten Salzpartikel in die weiche Matrix gedrückt werden. Die Folge war ein höheres Porenvolumen (70 Vol. %) und eine auf 1050 kg/m^3 gesunkene Dichte bei mit Wasser gefüllten Poren. Ein schwererer Träger hat in einem gerührten Kessel eine höhere Relativgeschwindigkeit zum Medium. Der laminare Grenzfilm um ein Silikonpartikel wird dadurch kleiner, und der Stofftransport aus der Kernphase an die Oberfläche wird erleichtert.

Titandioxid macht zudem den Silikonträger hydrophiler. Der Kontaktwinkel zwischen Wasser und Silikon wird deutlich verringert. Das bedeutet, daß ein solcher Träger besser mit Wasser benetzt wird und auch für die Besiedlung durch Bakterien besser geeignet ist. Nitritoxidierer wuchsen schneller auf titandioxidhaltigen als auf –freien Trägern auf, ihre Endaktivität war zudem deutlich höher. Der Sauerstoffpermeationskoeffizient des Silikonkautschuks wurde durch Titandioxid nur geringfügig verringert, er liegt aber wesentlich höher als bei Hydrogelen oder anderen Adsorbermaterialien.

Die Porenstruktur muß eine weite Verteilung aufweisen, damit der Träger optimal besiedelt wird. Eine Mischung aus 80 Vol. % Salz der Korngröße 100 bis $200 \mu\text{m}$ und 20 Vol. % der Größe unter $100 \mu\text{m}$ des Salzanteils des Silikon/Salzgemisches hat mehr Verbindungskanäle zwischen den Poren als ein Adsorber mit enger Porengrößenverteilung [81]. Zudem ist die Viskosität einer Silikon/Salzmischung mit größeren Partikeln geringer als mit kleineren.

5. Mathematische Modellierung autotropher Nitritoxidierer

Mathematische Modelle, die das mikrobielle Wachstums- und Produktionsverhalten beschreiben, lassen sich durch zwei Kriterien klassifizieren.

Ein Kriterium ist die **Segregation**. Zeitliche Segregation einer Submerskultur bedeutet, daß nicht alle Zellen an einem bestimmten Zeitpunkt den gleichen Entwicklungszustand einnehmen [85]. Eine solche Heterogenität liegt z.B. bei filamentös wachsenden Pilzen vor. Hier findet das Wachstum zumeist in der Hyphenspitze statt. Aynsley benutzt zur Beschreibung der Segregation ein Modell, das filamentöswachsende Pilze als Rohrreaktor darstellt. Nur Zellen an der Spitze bzw. einer Abzweigung teilen sich und lassen die Hyphe wachsen [86]. Ein weiteres Beispiel in der die Segregation deutlich zu Tage tritt, ist das Wachstumsverhalten tierischer und pflanzlicher Zellkulturen. Hier sind die Entwicklungszyklen der Zellen so lang, daß sich die Einzelzellen deutlich voneinander unterscheiden.

In einem unsegregierten Modell geht man dagegen davon aus, daß alle Zellen der Kultur denselben Zustand einnehmen und nicht zwischen einzelnen Individuen unterschieden werden kann [85]. Letzteres ist zwar eine starke Vereinfachung, doch ist die schwierige mathematische Formulierung und das Fehlen von Daten über Zellzahlverteilungen einzelner Zustände Grund für die Bevorzugung des unsegregierten Modells.

Ein zweites Kriterium ist die **Strukturierung**. Jede Zelle ist ein kompliziertes Multikomponentensystem. Es besteht aus Enzymen, die Regelungen unterliegen, und Zellkompartimenten, wie Mitochondrien oder dem Zellkern, die als eigenständige Reaktionsräume zu betrachten sind. Faßt man die Zelle als eine einzige Komponente auf, so führt dies zu einem unstrukturierten Modell. Es hat den Vorteil, einfach und übersichtlich zu sein, beschreibt aber nur die Quantität der biologischen Phase.

Mehr als eine Komponente führt zu einem strukturierten Modell, das den Vorteil besitzt, die Realität besser zu beschreiben, aber den Nachteil aufweist, einen großen Bedarf an Information und mathematischen Gleichungen zu benötigen.

Eine Form der Strukturierung tritt auf, wenn man immobilisierte Mikroorganismen betrachtet, deren Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechsel maßgeblich von der räumlichen Lage abhängig sind.

Durch Kombination der oben aufgeführten Kriterien Segregation und Strukturierung entstehen vier Modelltypen mit unterschiedlicher Komplexität (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1 Klassifizierung mathematischer Modelle nach Bailey und Ollis [87]

Unsegregiertes und unstrukturiertes Modell	Unsegregiertes und strukturiertes Modell
Segregiertes und unstrukturiertes Modell	Segregiertes und strukturiertes Modell

Das mikrobielle Wachstum kann unterschiedliche Phasen durchlaufen. Die mathematische Beschreibung der lag-Phase (der Phase langsamen Wachstums kurz nach der Beimpfung des Kulturgefäßes) ist schon von Aiba et al. durchgeführt worden [88].

Die zeitliche Abhängigkeit ist jedoch nur ein Symptom für ein komplexes Netzwerk aus Abhängigkeiten, die in der Literatur einzeln beschrieben wurden. So beschreiben Pruitt und Kamau beispielsweise die Abhängigkeit bakteriellen Wachstums von chemischen und physikalischen Faktoren[89]. Dabei betrachten sie nicht nur das Zellwachstum, sondern auch den Zelltod.

Eine Zelle kann auch Stadien durchlaufen, in denen sie nicht wächst, jedoch Energie verbraucht und sogar potentiell wachstumsfähig bleibt. Dieses Phänomen wird als Erhaltungsstoffwechsel oder Maintenance bezeichnet [90], [91], [92], [93].

Interessant sind die thermodynamischen Ansätze, die unter anderem den energetischen Aspekt in den Modellvorstellungen berücksichtigen [94], [95].

Biofilme und immobilisierte Mikroorganismen sind Systeme, bei denen neben einer zeitlichen Abhängigkeit auch eine räumliche Abhängigkeit auftritt. So nehmen die Edukte von außen nach innen ab, während die Produkte zunehmen. Das kann in Fällen eines sehr schwach im Medium löslichen Substrates, z.B. des Sauerstoffs, nur zu geringem Energiegewinn führen. Dieser reicht dann oftmals nicht aus, den Erhaltungsstoffwechsel zu versorgen. Die Folge ist ein Absterben von Biomasse in der Tiefe des Biofilms oder des Immobilisats, bei gleichzeitigem Wachstum in oberflächennahen Schichten [96], [97], [98].

5.1. Modellierung freikultivierter Nitritoxidierer im kontinuierlichen Reaktor

Die in den vorangegangenen Kapiteln gewonnenen kinetischen und physikalischen Daten wurden nun verwendet, um ein mathematisches Modell für die biologische Oxidation von Nitrit zu Nitrat durch autotrophe Nitrifikanten aufzustellen. Das Modell wurde im ersten Schritt für freie Zellen entwickelt und sollte anhand der Daten der kontinuierlichen Versuche verifiziert werden. In einem weiteren Schritt sollte das Modell auf immobilisierte Zellen erweitert werden (Kapitel 5.2).

Die Biomasse wurde für die Modellierung freier Zellen in zwei Kompartimente (aktive und inaktive Biomasse) strukturiert. Da eine zeitliche Segregation bei freisuspendierten Bakterien unter guten Wachstumsbedingungen keine Rolle spielt, führt das zu einem unsegregierten und strukturierten Modell.

Ausgangspunkt war dabei die Annahme, daß Sauerstoff und Nitrit die einzigen Substrate für die nitritoxidierenden Bakterien darstellen. Mit Hilfe des Sauerstoffs wird Nitrit ausschließlich zu Nitrat oxidiert.



Die folgenden Formeln geben das System der Differentialgleichungen wieder, die zur Aufstellung des mathematischen Modells notwendig sind. Das Biomassenwachstum läßt sich mit einer Kinetik, basierend auf der Theorie von Monod darstellen [14], [39]. Das Wachstum war von den Substraten Nitrit und Sauerstoff abhängig.

$$\mu = \mu_{\max} * \frac{C_{NO_2}}{K_{NO_2} + C_{NO_2}} * \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \quad (\text{Gl. 5-2})$$

Für Änderung von Edukten und Produkten gilt:

$$\frac{dS}{dt} = X_a * \left(\frac{[NO_2]}{K_{NO_2} + [NO_2]} * \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \right) * (Y_{S/X} * \mu_{\max} + m(s)) \quad (\text{Gl. 5-3})$$

Hier bezeichnet m(s) den Maintenancekoeffizienten bezogen auf die Substanz S.

Für aktive Biomasse (X_a) gilt:

$$\frac{dX_a}{dt} = X_a * \left(\frac{[NO_2]}{K_{NO_2} + [NO_2]} * \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \right) * \left(\mu_{\max} + \frac{m(s)}{Y_{S/X}} \right) - \frac{m(s)}{Y_{S/X}} * X_a \quad (\text{Gl. 5-4})$$

Biomasse stirbt oder wird inaktiviert und bildet das Kompartiment X_i , wenn die beiden Substrate limitiert sind.

$$\frac{dX_i}{dt} = \frac{m(s)}{Y_{S/X}} * X_a * \left(1 - \frac{[NO_2]}{K_{NO_2} + [NO_2]} * \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \right) \quad (\text{Gl. 5-5})$$

Dieses Gleichungssystem kann nicht mehr analytisch gelöst werden. Die Lösung mußte numerisch erfolgen.

Zur Lösung des Gleichungssystems und der Parameterabschätzung wurde das Programm SB ModelMaker der Firma SB Technology Ltd. herangezogen. Das Programm löste das Gleichungssystem mit einem Runge-Kutta-Algorithmus 4.Ordnung. Mit einem Algorithmus nach Marquard wurden die optimalen Parameterwerte bestimmt, um die Simulationsergebnisse an die gemessenen Daten anzupassen.

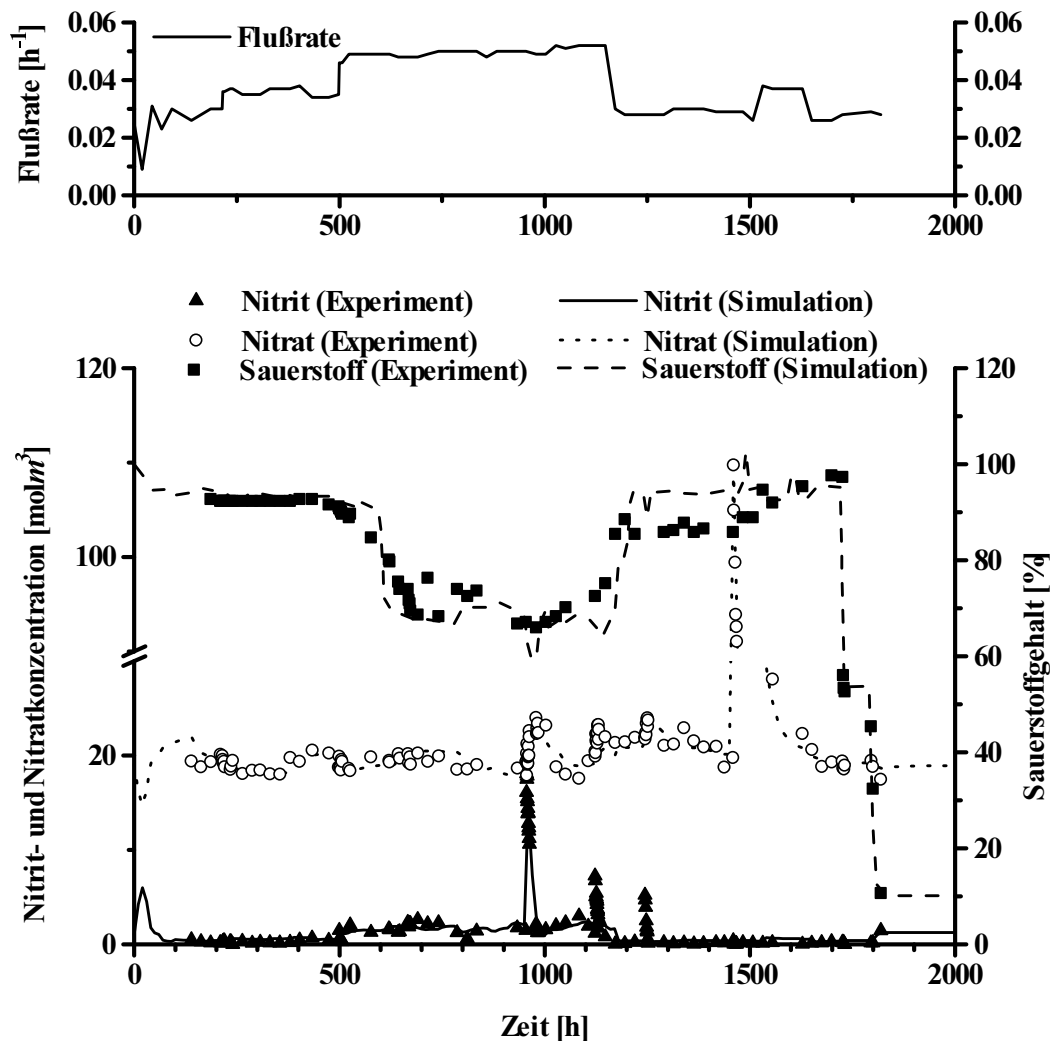


Abbildung 5-1 Simulation einer kontinuierlichen Kultivierung freier nitritoxidierender Bakterien bei 30°C [99] mit SB ModelMaker Version 2.0c

Als Meßwerte wurden die Ergebnisse der Kultivierung freier Nitritoxidierer von Brunke [99] herangezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem kontinuierlichen betriebenen Rührkessel mit einem Reaktionsvolumen von ca. 300 ml. Die Durchflußrate wurde in gewissen Abständen erhöht. Dabei wurde jeweils abgewartet bis sich der Stoffumsatz auf ein neues Gleichgewicht eingestellt hatte. Ebenso wie die Durchflußrate wurde auch der spezifische Stoffübergangskoeffizient k_{1a} variiert. Der k_{1a} -Wert wurde durch Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs und der Gelöstsauerstoffkonzentration berechnet (Tabelle 5-3). Nitrit wurde dem Reaktor impulsförmig hinzugesetzt, um das kurzzeitige Stoffwechselverhalten der Mikroorganismen zu untersuchen.

Die Ergebnisse des optimalen Simulationslaufs und die gemessenen Werte sind in Abbildung 5-1 dargestellt. Das angenommene mathematische Modell beschreibt den Kultivierungsverlauf in allen Phasen der Flußratenerhöhung sehr gut. Der Abbau des impulsförmig zugegebenen Nitrits wird durch das Modell ebenso dargestellt wie der Einfluß des verminderten Sauerstoffeintrags.

Tabelle 5-2 zeigt die kinetischen Parameter, die aus diesen Versuchen ermittelt wurden. Alle Parameter liegen im Bereich der in der Literatur beschriebenen Meßwerte.

Tabelle 5-2 Abgeschätzte Parameter der Kultivierung freier Nitritoxidierer

Parameter	Wert	Dimension	Literaturwert	Quellen
μ_{\max}	0,075	h^{-1}	0,025-0,058	[9]
K_{NO_2}	0,4	mol/m^3	0,226-1,68	[17]
K_{O_2}	0,018	mol/m^3	0,017	[100]
m (Nitrit)	$2,682 \cdot 10^{-3}$	$mol/(kg \cdot s)$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	[100]

Tabelle 5-3 Berechnete Parameter der Kultivierung freier Nitritoxidierer

Parameter	Wert	Dimension
$k_1 a$ (bis 600 h und zwischen 1200 und 1725 h)	20	h^{-1}
$k_1 a$ (600 bis 1200 h)	6	h^{-1}
$k_1 a$ (1725 bis 1800 h)	2,2	h^{-1}
$k_1 a$ (nach 1800 h)	1,1	h^{-1}

Tabelle 5-4 Parameter mit Literaturquelle [100]

Parameter	Wert	Dimension
$Y_{O_2/x}$	862	mol/kg
$Y_{NO_2/x}$	1724	mol/kg
$Y_{NO_3/x}$	1724	mol/kg

5.2. Modellierung immobilisierter Nitritoxidierer im kontinuierlichen Reaktor

Das Modell für freie Zellen sollte nun auf adsorptionsimmobilisierte Zellen erweitert werden. Neben dem zeitlichen Verlauf aller betrachteten Konzentrationen wurde hierbei auch der örtliche Verlauf der Konzentrationen im Partikel berechnet. Die Nitritoxidierer müssen ihren Erhaltungsstoffwechsel (Maintenance) und das Wachstum durch die Oxidation von Nitrit mit Sauerstoff betreiben. Wenn eines der beiden Substrate aufgrund des Stofftransportes in den Träger limitiert wird, können Zellen absterben. Diese Biomasse löst sich nicht in kürzester Zeit auf. Daher wurde die Gesamtmasse wie schon in dem Modell für freie Biomasse in einen aktiven und einen inaktiven Anteil untergliedert. Die inaktive Biomasse baut kein Nitrit ab, sie nimmt aber den begrenzten Raum in den Poren des Trägers mit in Anspruch.

Bakterien haften an der Silikonmatrix und an sich selbst. Dieses geschieht neben dem direkten Zellkontakt vor allem durch die Bildung externer Polysaccharide. Die Anheftung freisuspendierter Zellen an eine Oberfläche wird als Adsorption bezeichnet. Der entgegengesetzte Vorgang, die Desorption, ist die Ablösung von Zellen. Damit sich ein Biofilm bilden kann, müssen in der Anfangsphase die Adsorption und das Wachstum größer als die Desorption sein. Wird der äußere Biofilm zu groß, wirken die Scherkräfte des Mediums stärker auf die Zellen und führen damit zu deren Ablösung. Die Adsorption ist daher als proportional zu der Konzentration freisuspendierter Zellen zu sehen. Die Desorption ist proportional zur Biomassekonzentration in den äußeren Poren. Wanderung von Zellen in tiefere Porenschichten kann durch Diffusion, Zellwachstum oder Zellbewegung erfolgen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Größe der Verbindungskanäle deutlich unter dem der Poren liegen kann.

Das Modell war also in zweifacher Hinsicht strukturiert. Die Unterteilung der Biomasse in lebende und tote Zellen sowie die Biomassenverteilung in radialer Richtung in den Träger.

Die Silikonpartikel wurden zur Vereinfachung der mathematischen Beschreibung des Stofftransportes als ideale Kugeln angesehen. Dadurch war es möglich, den Transport mathematisch eindimensional darzustellen.

$$\frac{dc}{dt} = D_{eff} * \left(\frac{d^2c}{dr^2} + \frac{F}{r} * \frac{dc}{dr} \right) + R_s \quad (\text{Gl. 5-6})$$

Wobei für Kugeln $F = 2$ ist.

Für $s = O_2, NO_2$ oder NO_3 gilt:

$$R_s = X_a * \left(\frac{[NO_2]}{K_{NO_2} + [NO_2]} * \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \right) * (Y_{s/x} * \mu + m(s)) \quad (\text{Gl. 5-7})$$

Hier bezeichnet $m(s)$ den Maintenancekoeffizienten bezogen auf die Substanz S.

Für aktive Biomasse X_a gilt:

$$R_a = X_a * \left(\frac{[NO_2]}{K_{NO_2} + [NO_2]} * \frac{[O_2]}{K_{O_2} + [O_2]} \right) * \left(\mu_{\max} + \frac{m(s)}{Y_{s/x}} \right) - \frac{m(s)}{Y_{s/x}} * X_a$$

(Gl. 5-8)

Für inaktive Biomasse X_i gilt:

$$R_i = \frac{m(s)}{Y_{s/x}} * X_a * \left(1 - \frac{C_{NO_2}}{K_{NO_2} + C_{NO_2}} * \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \right)$$

(Gl. 5-9)

Da auch hier eine analytische Lösung nicht möglich war, wurde das Gleichungssystem mit der impliziten Methode der finiten Differenzen gelöst. Der Vorteil dieser Methode liegt in der einfachen Implementierung und ihrem stabilen Verhalten. Denn anders als der explizierte Ansatz ist die implizite Methode bei jeder Schrittweitenkombination stabil.

Die Differentiale können in Form von Differenzen beschrieben werden [101].

$$\frac{dc}{dt} \approx \frac{C_{i,j+1} - C_{i,j}}{k}$$

(Gl. 5-10)

$$\frac{d^2c}{dr^2} \approx \frac{C_{i+1,j+1} - 2C_{i,j+1} + C_{i-1,j+1} + C_{i+1,j} - 2C_{i,j} + C_{i-1,j}}{2h^2}$$

(Gl. 5-11)

$$\frac{dc}{dr} \approx \frac{C_{i+1,j+1} - C_{i-1,j+1} + C_{i+1,j} - C_{i-1,j}}{4h}$$

(Gl. 5-12)

Zeitschritt k und Raumschritt h werden zu folgender Konstante verknüpft:

$$f = \frac{k}{h^2}$$

(Gl. 5-13)

Nach Einsetzen und Umformen folgt:

$$\begin{aligned}
& C_{i-1,j+1} * [-\frac{Df}{2} + \frac{DFk}{4hr}] + \\
& C_{i,j+1} * [1 + Df] + \\
& C_{i+1,j+1} * [-\frac{Df}{2} - \frac{DFk}{4hr}] \\
& = \\
& C_{i-1,j} * [\frac{Df}{2} - \frac{DFk}{4hr}] + \\
& C_{i,j} * [1 - Df] + \\
& C_{i+1,j} * [\frac{Df}{2} + \frac{DFk}{4hr}] + \\
& R_s * k
\end{aligned} \tag{Gl. 5-14}$$

Analog lassen sich die Gleichungen für aktive und inaktive Biomasse aufstellen.

Um das Gleichungssystem der partiellen Differentialgleichungen zu lösen, bedurfte es mehrerer Randbedingungen.

Randbedingungen in der Perlenmitte für $t \geq 0$ und $r = 0$:

In der Perlenmitte gilt, daß das Konzentrationsprofil keine Steigung hat.

$$\frac{dc}{dr} = 0 \tag{Gl. 5-15}$$

Im Differenzenverfahren läßt sich dieses durch eine Spiegelung im Perlenmittelpunkt beschreiben, wobei gilt:

$$C_{i+1} = C_{i-1} \tag{Gl. 5-16}$$

Daraus folgt:

$$\begin{aligned}
 & C_{i-1,j+1} * (-Df) + \\
 & C_{i,j+1} * (1 + Df) \\
 & = \\
 & C_{i-1,j} * (Df) + \\
 & C_{i,j} * (1 - Df) + \\
 & R_s * k
 \end{aligned}
 \tag{Gl. 5-17}$$

Randbedingung am Perlenrand für $t \geq 0$

Am Perlenrand gilt, daß der Stofftransport, der durch den Gradienten in der äußersten Trägerschicht entsteht, dem Stofftransport in dem laminaren Grenzfilm um den Träger entspricht [82].

$$\frac{C_{1,j} - C_{2,j}}{h} * D = \beta * (bulk_j - C_{,j1})
 \tag{Gl. 5-18}$$

mit dem Stoffübergangskoeffizienten:

$$\beta = \frac{D_{eff}}{\delta}
 \tag{Gl. 5-19}$$

Die Gleichung ist für alle Zeitschritte $j+1$ gültig.

In Differenzendarstellung ergibt sich daraus folgender Term:

$$\begin{aligned}
& C_{1,j+1} * \left(1 + \frac{Df}{2} + \frac{k\beta}{2h} + \frac{DFk}{4hr} - \frac{\beta Fk}{4r} \right) + \\
& C_{2,j+1} * \left(-\frac{Df}{2} - \frac{DFk}{4hr} \right) \\
& = \\
& C_{1,j} * \left(1 - \frac{k\beta}{2h} - \frac{Df}{2} - \frac{DFk}{4hr} + \frac{\beta Fk}{4r} \right) + \\
& C_{2,j} * \left(\frac{Df}{2} + \frac{DFk}{4hr} \right) + \\
& bulk_{j+1} * \left(\frac{k\beta}{2h} - \frac{\beta Fk}{4r} \right) + \\
& bulk_j * \left(\frac{k\beta}{2h} - \frac{\beta Fk}{4r} \right) + \\
& R_s * k
\end{aligned} \tag{Gl. 5-20}$$

Insgesamt betrachtet, ergibt sich ein Gleichungssystem, das bei der Annahme von 11 Raumpunkten (10 Abstände) in Form folgender Matrix dargestellt werden kann.

$$\begin{vmatrix}
a_1 & b_1 & & & & & & d_1 \\
c_1 & a_2 & b_2 & & & & & d_2 \\
\vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\
& & & & c_9 & a_{10} & b_{10} & d_{10} \\
& & & & & c_{10} & a_{11} & d_{11}
\end{vmatrix} \tag{Gl. 5-21}$$

Da bei diesem Verfahren der Koeffizient d_i dem zukünftigen Zeitschritt $j+1$ entspricht, muß die Matrix implizit gelöst werden.

Die Konzentration des Mediums zum Zeitpunkt $j+1$ wird iterativ bestimmt.

Als Anfangsbedingungen wurde eine Startkonzentration für alle Komponenten innerhalb und außerhalb des Trägers gesetzt.

Grenzfilm

Nach der Filmtheorie muß um dieses Partikel ein Grenzfilm existieren, der frei ist von turbulenten Strömungswirbeln. In dieser Grenzschicht erfolgt der Stofftransport ebenfalls ausschließlich durch Diffusion. Die Stärke dieses Grenzfilms hängt ab vom Energieeintrag durch Rührorgane und Begasung. Nach Henzler gilt [102]:

$$\frac{Sh-2}{Sc^{1/3}} = 0,67 * \left(\frac{\varepsilon * d^4}{\nu^3} \right)^{1/8} \tag{Gl. 5-22}$$

$$Sc = \frac{\nu}{D} \quad (\text{Gl. 5-23})$$

$$\delta = \frac{d}{Sh} \quad (\text{Gl. 5-24})$$

Der laminare Grenzfilm liegt nach diesem theoretischen Ansatz je nach Energieeintrag zwischen 30 und 40 μm (Abbildung 5-2).

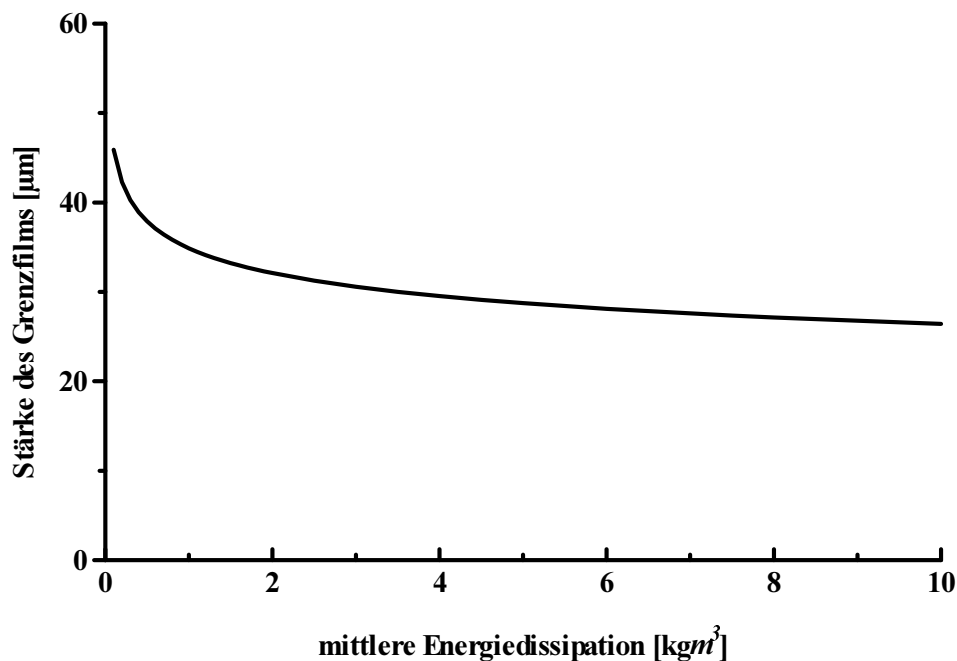


Abbildung 5-2 Stärke der laminaren Grenzschrift in Abhängigkeit von der mittleren Energiedissipation

Das Gleichungssystem wurde mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms gelöst (Quellcode siehe Kapitel 9)

Um das mathematische Modell mit Meßwerten zu vergleichen, wurden die Ergebnisse einer Kultivierung immobilisierter Nitritoxidierer herangezogen. Ein kontinuierlich betriebener Rührkessel mit einem Reaktionsvolumen von 320 ml wurde mit 1440 Silikonperlen mit einem Durchmesser von 1,7 mm (Durchschnittswert) gefüllt [99]. Nach einer kurzen Batch-Phase wurde der kontinuierliche Betrieb mit einer Durchflußrate von $0,035 \text{ h}^{-1}$ gestartet. Das Nitrit, daß in einer Konzentration von 20 mol/m^3 dem Reaktor zugeführt, konnte von den Nitritoxidierern fast komplett zu Nitrat umgesetzt werden. Nach 320 Stunden wurde die Flußrate auf $0,075 \text{ h}^{-1}$ erhöht. Hierbei war zu beobachten, daß der Umsatz von Nitrat deutlich

zurückging, um danach wieder auf das ursprüngliche Niveau anzusteigen. Es ist anzunehmen, daß die Nitritoxidierer, die sich frei im Medium befanden, ausgespült wurden und sich nun langsam in den Poren des Silikonträgers ansiedelten (Abbildung 5-3).

Das mathematische Modell ist in der Lage diesen dynamischen Kultivierungsverlauf zu beschreiben. Die Besiedlung des Trägers erfolgt vermehrt erst nach mehreren hundert Stunden, vor allem nachdem die Flußrate erhöht wurde (Abbildung 5-4). Zu beachten ist, daß das Modell einen ebenfalls steigenden Anteil nicht aktiver Biomasse im Träger berechnet (Abbildung 5-5). Das bedeutet, daß ein Träger nach einem gewissen Zeitraum eine große Menge an Biomasse enthält, die sich durch ihre Sauerstoffzehrung die Lebensgrundlage selbst einschränkt.

Das berechnete Sauerstoffprofil zeigt einen dementsprechenden Verlauf (Abbildung 5-6). Kurz vor Erhöhung der Durchflußrate beginnt die Sauerstoffkonzentration im Träger parallel zur wachsenden Biomassenkonzentration zu sinken. Selbst als die Nitratkonzentration wieder ein sehr hohes Niveau erreicht, sinkt der Sauerstoffgehalt im Träger nicht komplett auf sein Minimum zurück. Dieses Verhalten ist auf die Modellparameter zurückzuführen, die die Adsorption und Desorption von Mikroorganismen beschreiben. In der Anfangsphase siedeln Mikroorganismen vor allem an den äußersten Trägerschichten und verhindern durch ihre Aktivität das Eindringen von Sauerstoff in tiefere Trägerschichten. Diese Mikroorganismen gehen bei der Erhöhung der Durchflußrate zum Teil verloren.

Die Parameter, die für diese Simulation notwendig waren, wurden aus dem Modell für freie Zellen gewonnen, durch Messungen bestimmt oder aus der Literatur entnommen (Tabelle 5-5).

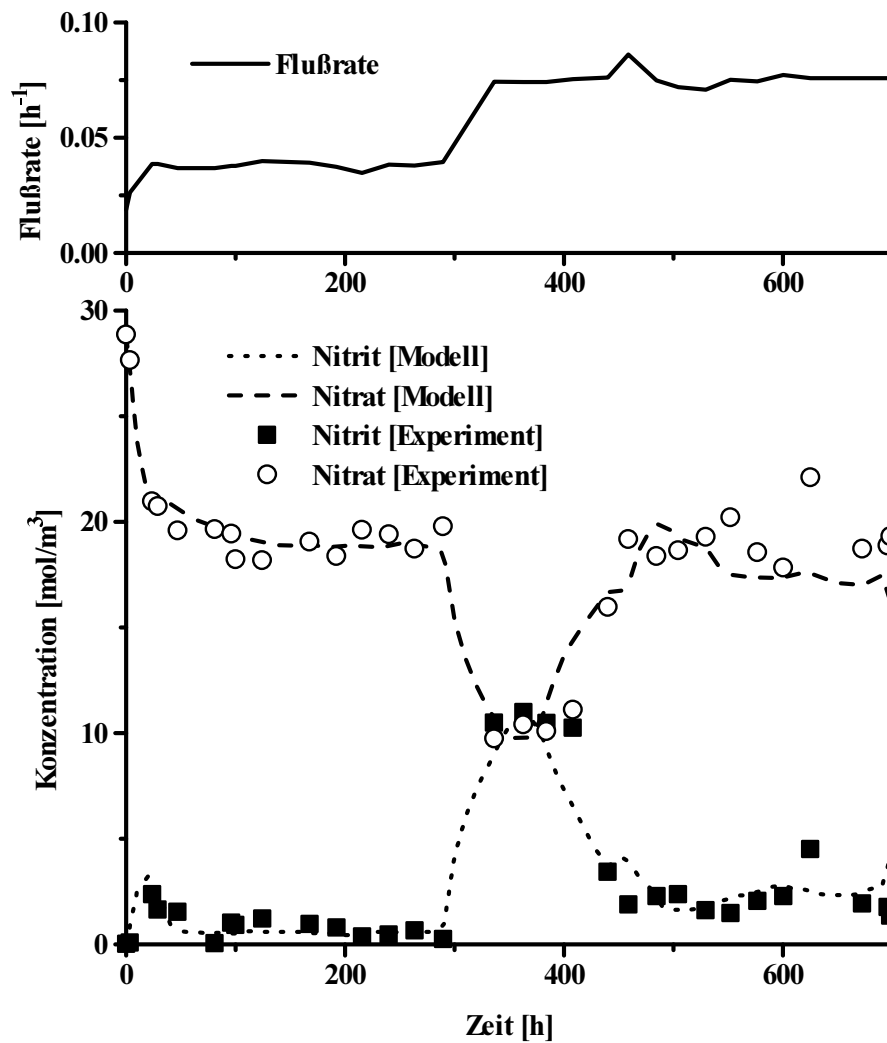


Abbildung 5-3 Vergleich der simulierten Verläufe der Nitrit und Nitratkonzentration im Medium mit den experimentell ermittelten Werten (Berechnung mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms; siehe Kapitel 9)

Tabelle 5-5 Modellparameter

Parameter	Wert	Dimension	Quelle
μ_{\max}	0.75	h^{-1}	freie Zellen
K_{NO_2}	0.4	mol/m^3	freie Zellen
K_{O_2}	0.018	mol/m^3	freie Zellen
$k_1 a$	37	h^{-1}	Messung
m (Nitrit)	$2,682 \cdot 10^{-3}$	h^{-1}	freie Zellen
$Y_{O_2/X}$	862	mol/kg	[100]
$Y_{NO_2/X}$	1724	mol/kg	[100]
$Y_{NO_3/X}$	1724	mol/kg	[100]
$D_{NO_2,Medium}$	$2.2 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	[103]
$D_{NO_3,Medium}$	$2.2 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	[103]
$D_{O_2,Medium}$	$2.83 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	[104]
$D_{X,Medium}$	$2.15 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	[48]
$D_{2,Träger}$	$1.54 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	berechnet
$D_{3,Träger}$	$1.54 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	berechnet
$D_{O_2,Träger}$	$15.0 \cdot 10^{-9}$	m^2/s	berechnet
$D_{X,Träger}$	$4.0 \cdot 10^{-19}$	m^2/s	abgeschätzt bis zu einer Tiefe von 200 μm
δ	$3 \cdot 10^{-5}$	m	Grenzfilmmodell

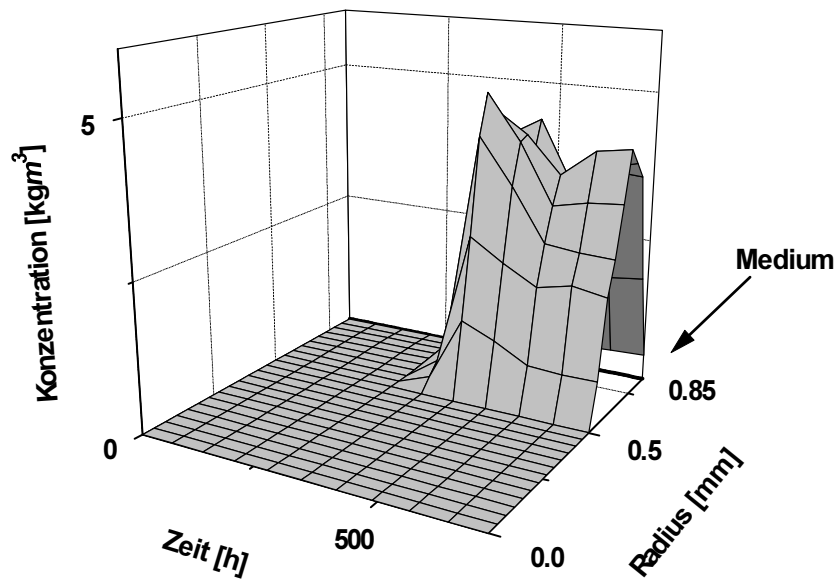


Abbildung 5-4 Simuliertes Profil aktiver Biomasse in einem mit Nitritoxidierern bewachsenen Silikonträger (Berechnung mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms; siehe Kapitel 9)

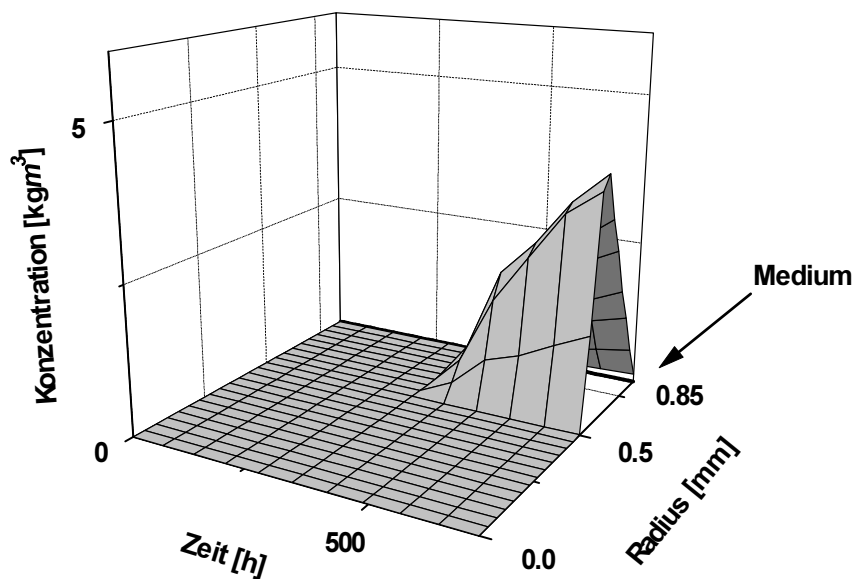


Abbildung 5-5 Simuliertes Profil inaktiver Biomasse in einem mit Nitritoxidierern bewachsenen Silikonträger (Berechnung mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms; siehe Kapitel 9)

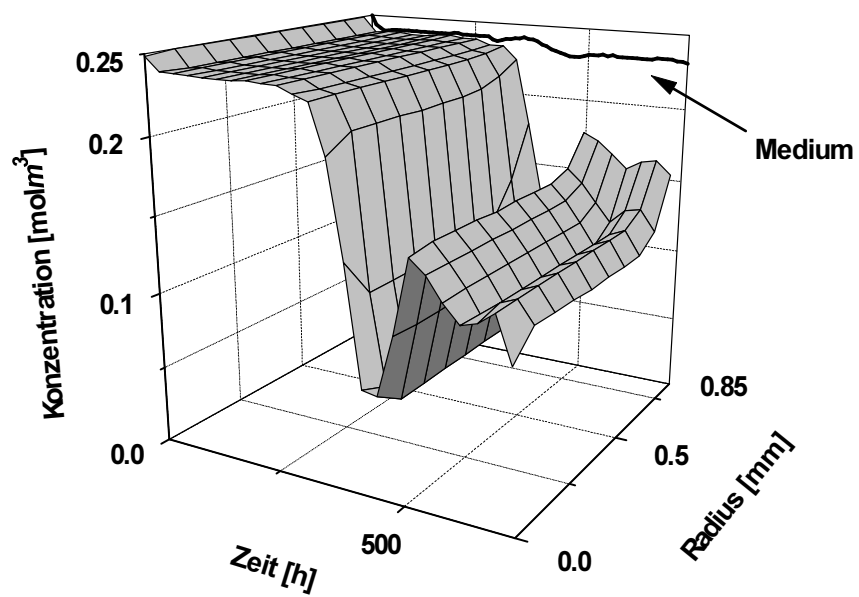


Abbildung 5-6 Simuliertes Sauerstoffprofil in einem mit Nitritoxidierern bewachsenen Silikonträger (Berechnung mit Hilfe eines selbstentwickelten Programms; siehe Kapitel 9)

5.3. Sensitivitätsanalyse

Eine Sensitivitätsanalyse soll Aufschluß über die Empfindlichkeit der einzelnen Modellparameter geben. Grundlage dafür bildet ein kontinuierlich betriebener Reaktor mit 320 ml Volumen, einer Durchflußrate von $0,15 \text{ h}^{-1}$ sowie einer Nitriteingangskonzentration von 20 mol/m^3 . Die in der Modellannahme eingesetzten 1440 Silikonperlen haben einen Durchmesser von 1,7 mm. Die Werte entstammen überwiegend aus dem Experiment von Brunke (Kapitel 5.2). Die Standard-Modellparameter sind Tabelle 5-5 aufgeführt. Als bestimmende Größe wurde die Nitratbildungsrate herangezogen. Durch Variation jeweils eines Parameters um 50 % nach oben und unten sollte sein Einfluß auf die Nitratbildungsrate bestimmt und in Relation zur Standardeinstellung gesetzt werden. Die oben genannten Parameter wurden so gewählt, das sie keinen limitierenden Einfluß auf die Nitratbildungsrate haben.

Es zeigt sich, daß die Sauerstofftransporteigenschaft der Matrix ein sehr empfindlicher Parameter des Modells ist. Eine Erhöhung um 50 % führt zu einer über 20 %igen Erhöhung der Nitratbildungsrate. Eine Verminderung führt zur Verringerung der Nitratbildung um den gleichen Wert. In der gleichen Größenordnung wird die Nitratbildungsrate durch die Stärke des laminaren Grenzfilms beeinflusst. Die Stärke des Grenzfilms ist entscheidend für den Stofffluß von der Kernflüssigkeit zur Partikeloberfläche. Ein stärkerer Grenzfilm vermindert, ein dünnerer erhöht die Aktivität. Deutlich geringer beeinflussen der übrigen Parameter die Nitratbildungsrate (Abbildung 5-7).

Abbildung 5-8 zeigt die simulierten Verläufe der oben geschilderten fiktiven Kultivierung unter Variation des Parameters Sauerstoffdiffusionskoeffizient in der Matrix. Zusätzlich neben dem Standardwert und der Variation um 50 % nach oben und unten wurde auch ein Diffusionskoeffizient von $0 \text{ m}^2/\text{s}$ für die Berechnung herangezogen. Dieses entspricht zum Beispiel Materialien ohne Sauerstoffdurchlässigkeit wie Glas oder Polyethylen. Nach der Modellannahme ist die Sauerstoffversorgung durch die Matrix zehnmal größer als Transporte durch das mit Kulturflüssigkeit gefüllte Porensystem.

Die Porosität ist dagegen ein unempfindlicherer Parameter, was die Nitratbildungsrate angeht. Es ist jedoch festzustellen das der zeitliche Verlauf der Nitratbildung abhängig ist vom Porenvolumen des Trägers. Erhöht man den Modellparameter Porösität von standardmäßig 70 % auf 80 % wird das Maximum der Aktivität wesentlich früher erreicht. Eine Verringerung um 10 Prozentpunkte hat dagegen keinen Einfluß (Abbildung 5-9).

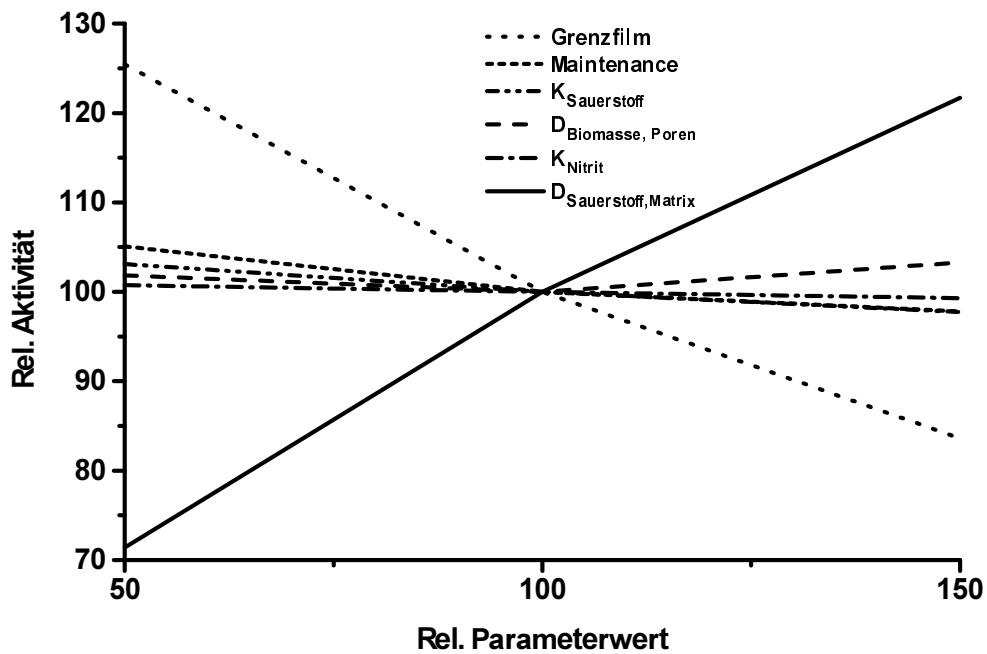


Abbildung 5-7 Sensitivität der Modellparameter auf die Endaktivität

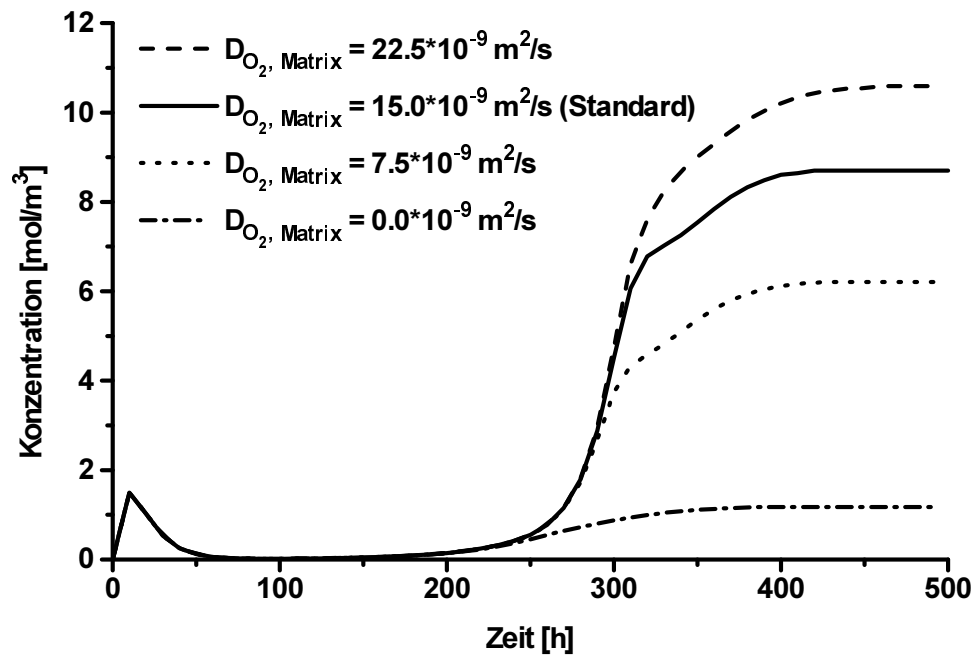


Abbildung 5-8 Simulierter Verlauf Kultivierung von Nitritoxidierern unter Variation des Parameters Sauerstoffdiffusionskoeffizient in der Trägermatrix

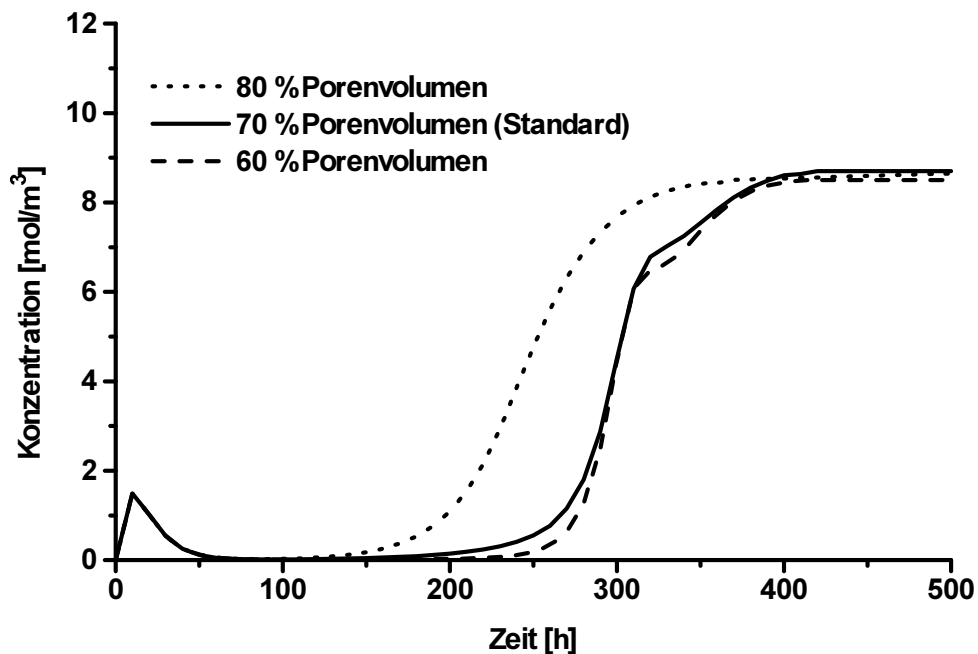


Abbildung 5-9 Simulierter Verlauf Kultivierung von Nitritoxidierern unter Variation des Parameters Porosität der Trägermatrix

In einer weiteren Abbildung sind die variierten Werte der übrigen Parameter dargestellt. Die Parameter wurden um jeweils 50 % nach oben und unten verändert. Berechnet wurde die relative Aktivität in bezug auf die Standardparameterwerte. Die empfindlichsten Parameter sind, wie schon oben dargestellt, der Sauerstoffdiffusionskoeffizient in der Matrix und die Stärke des externen Grenzfilms. Beide Parameter spiegeln die starke Abhängigkeit der Reaktion vom limitierenden Faktor der Sauerstoffversorgung der Zellen im Träger wieder.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Überlebensrate von Ammoniakoxidierern aus der Gruppe autotropher Nitrifikanten konnte beim Einschluß in Polycarbamoylsulfonat (PCS) – Hydrogele verbessert werden. Dieses geschah durch verschiedene Vorgehensweisen. Dazu gehörte die Verringerung des Verhältnisses von Isocyanat-Gruppen zu Hydroxylgruppen bei der Synthese der Polyurethan-Präpolymere auf ein Verhältnis von 1,4 zu 1. Ein weiterer Weg war der Einsatz von Aktivkohle als Adsorber und der Wahl geeigneter pH-Werte während der gesamten Immobilisierung. Durch alle drei Faktoren konnte die Überlebensrate der Ammoniakoxidierer, gemessen in Form der Anfangsaktivität, von 0,01 % auf über 70 % erhöht werden. Die Anfangsaktivität von Nitritoxidierern erwies sich als relativ unabhängig von diesen Parameter. Nitritoxidierer können auch bei nicht optimalen Bedingungen sehr erfolgreich in PCS eingeschlossen werden.

Die Stabilität der PCS-Hydrogele liegt bei 7000 Pa. Die als Additiv eingesetzte Aktivkohle Hydrodarco C erhöht die Stabilität um 50 %.

Es konnte ein Verfahren entwickelt werden, poröse Adsorber aus Silikonkautschuk mit enger Partikelgrößenverteilung für die Adsorptionsimmobilisierung herzustellen. Dieses wurde durch eine Apparatur erreicht, die einen Vollstrang aus unvernetztem Silikon und Feststoffen durch eine Schneidapparatur in Partikel definierter Größe zerteilte.

Der Vergleich mit porösem Glas zeigte, daß Nitritoxidierer deutlich höhere Aktivitäten aufwiesen, wenn sie auf diesen porösen Silikonadsorbern immobilisiert und in einer Langzeitkultivierung eingesetzt wurden. Titandioxid verbessert als Zuschlagsstoff zum Silikonkautschuk die Dichtedifferenz des Trägers zum wäßrigen Medium und verleitet der Oberfläche hydrophilere Eigenschaften. Mit solchen schweren Silikonträgern wurden Abbauraten von 30 $\mu\text{mol Nitrit}/(\text{min} * \text{ml Träger})$ erreicht. Auf porösem Glas erreichten die adsorptionsimmobilisierten Nitritoxidierer lediglich einen Wert von 15 $\mu\text{mol}/(\text{min} * \text{ml Träger})$.

Silikonträger sind als geeignetes Material für eine Vielzahl aerober biologischer Prozesse anzusehen, die nicht allein auf Bakterien beschränkt sind.

Das Aufwuchsverhalten von Nitritoxidierern auf porösen Silikonträgern während einer kontinuierlichen Kultivierung läßt sich mit Hilfe eines mathematischen Modells beschreiben dessen Parameter anhand einer Kultivierung freier Zellen ermittelt sowie aus Literaturdaten herangezogen wurden.

Das Modell ist in der Lage dynamische Veränderungen einer Kultivierung (Erhöhung der Durchflußrate) und daran geknüpft die zeitliche und örtliche Änderung aller Komponentenkonzentrationen abzubilden. Eine Sensibilitätsanalyse ergab, daß die Parameter „Stärke der externen Grenzschicht“ und „Sauerstoffdiffusionskoeffizient“ in der Trägermatrix den größten Einfluß auf die Resultate der Modellierung haben. Andere Parameter spielen dagegen eine untergeordnete Rolle. Das Modell der adsorptionsimmobilisierten Nitritoxidierer kann als Basis für die Modellierung weiterer sauerstoffverbrauchender Mikroorganismen dienen, die auf Silikonträgern immobilisiert werden können. Mit Hilfe des Modells könnte ein solcher Prozeß zudem optimiert werden.

7. Anhang

7.1. Geräte

Ammoniumanalytik

Pumpe	Model 2150, LKB Bromma, Schweden
Probenaufgabe	Autosampler Typ Basic Marathon, Probenvolumen 20 µl, Fa. Spark Holland, Fa. Techlab, Erkerode
Detektion	UV-VIS-Detektor Typ SPD 6AV, photometrisch bei 420 nm, Fa. SHIMADZU, Duisburg
Auswertung	Integrator Typ C-R6A, Fa. SHIMADZU, Duisburg

Meßapparatur mit membranüberzogenen O₂-Elektroden

Rührreaktor	Plexiglas, Eigenbau Institut für Technologie, FAL, Braunschweig
Sauerstoffelektrode	TriOxmatic EO 201 mit TG/OCI Tischgehäuse, WTW, Weilheim
Thermostat	RC 20, Meßgerätewerk Lauda, Lauda-Königshofen
Schwebekörperdurchflußmesser	Fischer & Porter, Göttingen
Mechanisches Rührwerk	RW 20 DZM, IKA-Labortechnik, Staufen
Multimeter	177 DMM, Keithley, USA
Schreiber	Multipenrecorder, Rikadenki, Tokyo, Japan

Diffusionsmessung

Differential-Refraktometer	RCD 201, Melz, Berlin
Diffusionsmeßzellen	Zweiteilig, Glas, thermostatisierbar, Eigenbau, Institut für Technische Chemie, TU-Braunschweig
Thermostat	RC 20, Meßgerätewerk Lauda, Lauda-Königshofen
Magnetrührwerk	Ikamag-Reo, IKA-Werk, Staufen
Mechanisches Rührwerk	KPG-Rührer

Nitrit/Nitrat-Analytik

Pumpe	Modell 300C, Gynkotek, München
Probenaufgabe	Autosampler Promis, Spark, Holland
Vorsäule	20 x 2,5 mm, Perisorp-RP-18 30-40 µm, Merck, Darmstadt
Trennsäule	60 x 4,6 mm, ODS-Hypersil 3 µm, Techlab, Erkerode
UV-Detektor	TYP 2151, LKB-Bromma, Schweden
Datenverarbeitung	LC-10-System mit CBM, Shimadzu, Japan

Sonstige Geräte

Autoklav	Fedegari, Techomara, Albuzzano, Italien
Kontaktwinkelmeßsystem	G 30 mit installierter Rechneinheit und Videosystem, Krüss, Hamburg
Kontaktwinkelmeßsystem	G 30 mit installierter Rechneinheit und Videosystem, Krüss, Hamburg
Laborsiebmaschine	Retac 3D, Retsch, Haan
Laborsiebmaschine	Retac 3D mit Analysensieben aus Edelstahl nach DIN 4188, Retsch, Haan
Mikroskop	Axioplan mit Neofluar-Phasenkontrastoptik, Zeiss, Oberkochen
PH-Meter	CG 174, Schott Meßgeräte, Mainz
Photometer	PM2A, Zeiss, Oberkochen
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE 121 mit thermostatierbarem Wasserbad, Büchi Laboratoriums-Technik AG, Flail, Schweiz
Rotationsviskosimeter	Rotovisco RV 20 mit Rheocontroller R 20 B, Haake Meßtechnik, Karlsruhe
Rotationsviskosimeter	Rotovisco RV 20 mit Rheocontroller R 20 B, Haake Meßtechnik, Karlsruhe
Rührer	IKAMAG REO, IKA-Labortechnik
Stereomikroskop	STEMI SV8, Zeiss, Oberkochen
Variofuge	20RS mit Rotor HFA 22.50, Heraeus, Hannover
Versuchsapparatur für den Zug- und Drucktest	Eigenbau, Institut für Technische Chemie, TU-Braunschweig
Versuchsapparatur für den Zugtest	Eigenbau Institut für Technische Chemie, TU-Braunschweig
Vortex	Genie 2, Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zentrifuge	5417 R, Eppendorf, Engelsdorf

Software

SB ModelMaker Version 2.0c	Developed by SB Technology Ltd, Oxford UK
----------------------------	---

Die REM-Aufnahmen wurden im Institut für Pflanzenbau, der FAL, TU-Braunschweig durchgeführt.

7.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien in Analysenqualität der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Aktivkohle	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Aktivkohlen: Hydrodarco C; W20; W35; SA4	Norit, Amersfort, Niederlande
Alginat, Protanal LF 20/60	Protan, Drammen, Norway
Attagel 50	Chemie Mineralien AG
Di-Kaliumhydrogenphosphat, rein	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
EDTA, (Na-Salz), 11280	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Riedel-de Haen, Seelze-Hannover
Lupranol VP 9205	BASF, Ludwigshafen
Methanol, HPLC-Solvent	Fisons Scientific Equipment, Loughborough, Großbritannien
Natriumcarbonat, reinst	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit, p.A.	Riedel - de Haen, Seelze-Hannover
Natriumthiosulfat, rein	Riedel - de Haen, Seelze-Hannover
Octylamin, 98 %ig in Wasser	Merck, Darmstadt
PDADMAC S3654	Hoechst, Frankfurt
Phenolrot, reinst 32095	Serva, Heidelberg
Praestol 611	Stockhausen AG
PSS Cat #08773 500000Da	Polysciences, Warrington, USA
Schaumglas	Poraver, Dennert, Heng
Silopren U Katalysator Pt-L	Bayer AG, Leverkusen
Silopren U Vernetzer 260	Bayer AG, Leverkusen
Silopren U1	Bayer AG, Leverkusen
Titandioxid 2073, 2210 und 2220	Kronos Titan-GmbH, Leverkusen
Zeolith W894	Bayer AG, Leverkusen
Zeolith Y	Bayer AG, Leverkusen

7.3. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
E	Enzym
FIA	Fließinjektionsanalyse
HAO	Hydroxylaminoxidoreductase
HPLC	high performance liquid chromatographie
INT	Iodonitrotetrazolium
NAD	Nicotinamiddinucleotid
PCS	Polycarbamoylsulfonat
PDMDAAC	Polydimethyldiallylammoniumchlorid
PDMS	Polydimethylsiloxan
PSS	Polystyrolsulfonsäure
PUR	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
RTV-2	Raumtemperatur-Vernetzung, Komponenten
SI	Silikonkautschuk
TDI	Toluylendiisocyanat
TISI	Titandioxidhaltige Silikonträger

7.4. Formelzeichen

Formelzeichen	Dimension	Bedeutung
a	[m ²]	Querschnittsfläche
bulk	[kg/m ³]	Konzentration in der bulk-Phase
C	[mol/m ³]	Konzentration
D	[m ² /s]	Diffusionskoeffizient
d	[m]	Durchmesser
E	[Pa]	Elastizitätsmodul
F	[-]	Formfaktor
H	[m]	Raumschritt
K	[s]	Zeitschritt
k _a	[h ⁻¹]	volumenspez. Stoffdurchgangskoeffizient
K _s	[mol/m ³]	Substratsättigungskonstante
L	[-]	Labyrinthfaktor
M	[mol/(kg *s)]	Maintenance
P	[-]	Porosität
R	[m]	Radius

Re	[-]	Reynolds-Zahl
R_s	[mol/m ³]	Stoffänderungsgeschwindigkeit
R_x	[kg/m ³]	Stoffänderungsgeschwindigkeit (Biomasse)
Sc	[-]	Schmidt-Zahl
Sh	[-]	Sherwood-Zahl
V	[m ³]	Volumen
V_x	[-]	Volumenanteil
X	[kg/m ³]	Biomassekonzentration
$Y_{s/x}$	[mol/kg]	Ausbeutekoeffizient
ΔF	[N]	Kraftänderung
β	[m/s]	Stoffübergangskoeffizient
ε_x	[-]	Massenanteil
$\bar{\varepsilon}$	[W/kg]	Mittlere Energiedissipation
μ	[s ⁻¹]	Spezifische Wachstumsrate
$\Delta \varepsilon$	[-]	rel. Dehnung

7.5. Indices

a	aktiv
eff	effektiv
I	inaktiv
i	Index (Raumrichtung)
j	Index (Zeitrichtung)
max	maximal
Medium	Medium
S	Substrat
Träger	Träger
X	Biomasse

8. Literaturverzeichnis

- [1] Wiesmann U. Biological Nitrogen Removal from Wastewater. In: Advances in Biochemical Engineering, Vol 51. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1994.
- [2] Roth L. Wassergefährdende Stoffe. Landsberg: Ecomed Verlagsgesellschaft; 1988.
- [3] Schlegel HG. Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Thieme Verlag; 1985.
- [4] Bock E. Nitrifikation - die bakterielle Oxidation von Ammoniak zu Nitrat. Forum Microbiologie, 1980, 1: 24-30.
- [5] Keeney DR. Inhibition of Nitrification in Soils. In: Nitrification. Prosser JI (Hg). Oxford, Washington: IRL Press; 1986.
- [6] Bock E, Koops HP, Ahlers B, Harms H. Oxidation of Inorganic Nitrogen Compounds as Energy Source. In: Variations in Autotrophic Life. Shiveley JM, Barton LL (Hg). Berlin: Springer-Verlag; 1991.
- [7] Wood PM. Nitrification as a Bacterial Energy Source. In: Nitrification. Oxford Washington: IRL Press; 1986.
- [8] Anthonisen AC, Loehr RC, Prakasam TBS, Srinath EG. Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid. Journal WPCF. 1976; 48: 835-852.
- [9] Prosser, JI. Autotrophe Nitrification in Bacteria. Advances in Microbial Physiology. 1989; 30: 125-181.
- [10] Fdz-Polanco F, Villaverde S, Garcia PA. Temperature Effect on Nitrifying Bacteria Activity in Biofilters: Activation and free ammonia inhibition. Wat Sci Tech. 1994; 30: 121-130.
- [11] Quinlan AV. Prediction of the Optimum pH for Ammonia-n Oxidation by Nitrosomonas europaea in Well-Aerated Natural and Domestic-Waste Waters. Water Res. 1984; 18: 561-566.
- [12] Chem SS, Chen WC. Organic Carbon Supplement Influencing Performance of Biological Nitrification in a Fluidized Bed Reactor. Wat Sci Tech. 1994; 30: 131-142.
- [13] Schenk H, Hegemann W. Nitrifikationshemmung durch hohe Salzkonzentrationen bei der aeroben biologischen Behandlung von Gerbereiabwasser. Gwf Wasser Abwasser. 1995; 136: 465-470.
- [14] Muttzahl K. Modellierung von Bioprozessen: eine Einführung für Praktiker and Studierende. Hamburg: Behr's Verlag; 1994.
- [15] Hartmeier W. Immobilisierte Biokatalysatoren. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1986.
- [16] Willaert RG, Baron GV, de Backer L. Immobilised Living Cell Systems. Modelling and Experimental Methods. Chichester: John Wiley Sons Ltd; 1996.
- [17] Hunik JH. Engineering Aspects of Nitrification with Immobilized Cells. Wageningen: Dissertation; 1994.

- [18] Wijffels RH. Nitrification by Immobilized Cells. Wageningen: Dissertation; 1994.
- [19] dos Santos VAPM, Bruijnse M, Tramper J, Wijffels RH. The Magic-Bead Concept: an Integrated Approach to Nitrogen Removal with Co-Immobilized Microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1996; 45: 447-453.
- [20] Hunik JH, Tramper J, Wijffels RH. A Strategy to Scale Up Nitrification Processes with Immobilized Cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Engineering.* 1994; 11: 73-82.
- [21] Bakker WA, Kers P, Beeftink HH, Tramper J, de Gooijer CD. Nitrite Conversion by Immobilized *Nitrobacter agilis* Cells in an Air-Lift Loop Bioreactor Cascade: Effects of combined substrate and product inhibition. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* 1996; 81: 390-393.
- [22] Buchholz K, Kasche V. *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie.* Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1997.
- [23] Sumino T, Nakamura H, Mori N, Kawaguchi N, Tada M. Immobilization of Nitrifying Bacteria in Porous Pellets of Urethan Gel for Removal of Ammonium Nitrogen from Waste-Water. *Applied and Microbiology.* 1992; 36: 556-560.
- [24] Beyersdorf J. Polyurethan-Präpolymere zur Immobilisierung von lebenden Zellen und Enzymen - Entwicklung von Immobilisierungsverfahren und Charakterisierung der Biokatalysatoren. TU-Braunschweig: Dissertation; 1992.
- [25] Vorlop KD, Muscat A, Beyersdorf J. Entrapment of Microbial Cells within Polyurethane Hydrogel Beads with the Advantage of Low Toxicity. *Biotechnology Techniques.* 1992; 6: 483-488.
- [26] Willke B, Willke T, Vorlop KD. Poly(carbamoylsulphonate) as a Matrix for Whole Cell Immobilization – Biological Characterization. *Biotechnology Techniques.* 1994; 8: 623-626.
- [27] Muscat A, Beyersdorf J, Vorlop KD. Poly(carbamoylsulfonate), a Material for Immobilization: Synthesis, Diffusion and Mechanical Properties. *Biotechnology Techniques.* 1993; 7: 591-596.
- [28] Kay MJ, Morton LHG, Prince EL. Bacterial Degradation of Polyester Polyurethane. *International Biodeterioration.* 1991; 27: 205-222.
- [29] Bauer G. Alkoholyse-Chemisches Recyclingverfahren für PUR und gemischte Kunststoffabfälle. *Kunststoffe.* 1994; 81: 301-305.
- [30] Lewin R. Microbial Adhesion is a Sticky Problem. *Science.* 1984; 224: 375-377.
- [31] Gjaltema A, Vinke JL, von Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Abrasion of Suspended Biofilm Pellets in Airlift Reactors: Importance of Shape, Structure and Particle Concentrations. *Biotechnology and Bioengineering.* 1997; 53: 88-89.
- [32] Chang HT, Rittnabb BE, Amar D, Heim R, Ehlinger O, Lesty Y. Biofilm Detachment Mechanisms in a Liquid-Fluidized Bed. *Biotechnology and Bioengineering.* 1991; 38: 499-506.

- [33] Peyton BM, Characklis WH. A Statistical Analysis of the Effect of Substrate Utilization and Shear Stress on the Kinetics of Biofilm Detachment. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993; 41: 728-735.
- [34] Spassov G, Christov P, Pramatarova V. Conversion of D-Sorbit to L-Sorbose by Cells of *Acetobacter suboxydans* Immobilized in Sintered Glass. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995; 43: 35-37.
- [35] Willaert RG, Baron GV. The Dynamic Behaviour of Yeast Cells Immobilised in Porous Glass Studied by Membrane Mass Spectrometry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1995; 42: 664-670.
- [36] Denkbass EB, Hoffman AS, Piskin E. Silikone-Based Microcarriers: Preparation and BHK Cell Culture. *The Chemical Engineering Journal*. 1995; 58: 65-70.
- [37] Özoguz G, Rübinger N, Baumgärtl H. Membraneinsatz zur Erhöhung der Nitrifikationsleistung durch getrennte Substratversorgung. *Bio forum*. 1994; 17: 129-135.
- [38] Muscat A. Entwicklung und Charakterisierung von polymeren Trägern- und Immobilisatmaterialien für eine verbesserte Sauerstoffversorgung. TU-Braunschweig: Dissertation; 1995.
- [39] Wolf KH. Kinetik in der Bioverfahrenstechnik. Hamburg: Behr's Verlag; 1991.
- [40] Benefield L, Molz F. Mathematical Simulation of a Biofilm Process. *Biotechnology and Bioengineering*. 1985; 27: 921-931.
- [41] Horn H, Hempel DC. Modellierung von Substratumsatz und Stofftransport in Biofilmsystemen. *Gwf Wasser Abwasser*. 1996; 6: 293-301.
- [42] Wanner O, Cunningham AB, Lundman R. Modeling Biofilm Accumulation and Mass Transport in a Porous Medium Under High Substrate Loading. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995; 47: 703-712.
- [43] Clark DS, Bailey JE, Do DD. A mathematical model for restricted diffusion effects on macromolecule impregnation in porous supports. *Biotechnology and Bioengineering*. 1985; 27: 208-213.
- [44] Gjaltema A, van der Marel N, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Adhesion and Biofilm Development on Suspended Carriers in Airlift Reactors: Hydrodynamic Conditions versus Surface Characteristics. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997; 55: 880-889.
- [45] Tijhuis L, van Loosrecht MCM, Heijnen JJ. Dynamics of Biofilm Detachment in Biofilm Airlift Suspension Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995; 45: 481-487.
- [46] Tijhuis L, van Loosrecht MCM, Heijnen JJ. Formation and Growth of Heterotrophic Aerobic Biofilms on Small Suspended Particles in Airlift Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 1994; 44: 595-608.

- [47] Tijhuis L, Huisman JL, Hekkelman HD, van Loosrecht MCM, Heijnen JJ. Formation of Nitrifying Biofilms on Small Suspended Particels in Airlift Reactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 1995; 47: 585-595.
- [48] Wanner O, Reichert P. Mathematical Modeling of Mixed-Culture Biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996; 49: 172-184.
- [49] Wanner O, Gujer W. A Multispecies Biofilm Model. *Biotechnology and Bioengineering*. 1986; 28: 314-328.
- [50] Willke T. Reaktionskinetische und wachstumsphysiologische Untersuchungen an freien und immobilisierten Nitrifizierern. FAL-Braunschweig, Sonderheft 186 (Dissertation); 1998.
- [51] Goyal SS, Rains DW, Huffacker RC. Determination of Ammonium Ion by Fluorometry or Spectrophotometry after On-Line Derivatization with o-Phthalaldehyde. *Anal Chem*. 1998; 60: 175-179.
- [52] Jekel M. persönliche Mitteilung; 1995.
- [53] Zimmermann et al. Simultaneous Determination of the Total Number of Aquatic Bacteria and the Number thereof Involved in Respiration. *Appl Env Microbiology*. 1978: 926-935.
- [54] Kies U. Modellierung des Abbaus von Chinolin durch *Comamonas acidovorans*. Düsseldorf: VDI-Verlag; 1998.
- [55] DIN 53504: Prüfung von Kautschuk und Elastomeren. Bestimmung von Reißfestigkeit, Zugfestigkeit, Reißdehnung und Spannungswerten im Zugversuch. Berlin: Beuth Verlag GmbH; 1994.
- [56] Bayer O. Neuere Entwicklungen des Diisocyanat-Polyadditions-Verfahrens (Polyurethane). *Farbe und Lacke*. 1958; 64: 235-241.
- [57] Uhlig K, Dietrich D. Polyurethane. *Ullmanns Enzyklopadie der technischen Chemie*. Bd 19, 4.Auflage. Weinheim: Verlag Chemie; 1980.
- [58] Beyersdorf J. Polyurethan-Präpolymere zur Immobilisierung von lebenden Zellen und Enzymen – Entwicklung von Immobilisierungsverfahren und Charakterisierung der Biokatalysatoren. TU-Braunschweig: Disseratation; 1992.
- [59] Thiele H, Langmarcack L. Symplexbildung and Komplekoazervation als Ionenreaktion bei Polyelektrolyten. *Z physik Chem*. 1957; 206: 395-413.
- [60] Thiele H, Schacht E. Über Ionenreaktionen bei Polyelektrolyten, Vorstufen bei der Bildung von Gelen. *Z physik Chem*. 1957; 208: 42-58.
- [61] Dautzenberg H, Dautzenberg H. Zum Einfluß des Salzgehaltes auf die Bildung und Struktur von Polyelektrolytkomplexen (Symplexen). *Acta Polym*. 1985; 36: 102-107.
- [62] Bettin A. Immobilisierung und Charakterisierung einer Mischkultur autotropher Nitrifikanten. TU-Braunschweig: Diplomarbeit; 1994.
- [63] Dietrich D, Petersen S. Die Bedeutung der Polyurethan-Chemie und der daraus resultierenden Elastomeren. *Kautschuk und Gummi Kunststoffe*. 1974; 27: 467-476.

- [64] Belser IW. Bicarbonate Uptake by Nitrifiers: Effects of Growth Rate, pH, Substrate Concentration and Metabolic Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 48: 1100-1104.
- [65] Hooper AB. Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. In: Schlegel HG, Bowien (Hg): *Autotrophic Bacteria*, Kapitel 13. Berlin: Springer-Verlag; 1989.
- [66] Bakker WAM, Kers P, Beeftink HH, Tramper J, De Gooijer CD. Nitrite Conversion by Immobilized *Nitrobacter agilis* Cells in an Air-Lift Loop Bioreactor Cascade: Effects of Combined Substrate and Product Inhibition. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1996; 81: 390-393.
- [67] Keener WK, Arp DJ. Transformations of aromatic compounds by *Nitrosomonas europaea*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994; 60: 1914-1920.
- [68] Aktivkohle-Eine Einführung. Produktinformation der Firma Norit N.V., Niederlande.
- [69] Hooper AB. Lag Phase of Ammonia Oxidation by Resting Cells of *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*. 1969; 97: 968-969.
- [70] Garrido JM, van Benthum WAJ, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ. Influence of Dissolved Oxygen Concentration on Nitrite Accumulation in a Biofilm Airlift Suspension Reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 1997; 53: 168-178.
- [71] Liu Y, Capdeville B. Some Observations on Free Ammonia Inhibition to *Nitrobacter* in Nitrifying Biofilm Reactor. *Biotechnology Letters*. 1994; 16: 309-314.
- [72] Becker R, Schimpfle HU. Beziehungen zwischen Struktur und Eigenschaften bei Polyurethanen. *Plaste und Kautschuk*. 1975; 22: 15-18.
- [73] Poltersdorf S, Tümmler A, Poltersdorf B. Einfluß von Füllstoffen auf das viscoelastische Verhalten von Kautschuk- und Gummimischungen. *Plaste und Kautschuk*. 1986; 33: 254-257.
- [74] Wick M, Kreis G, Kreuzer FH. Silicone. *Ullmanns Enzyklopadie der technischen Chemie*. Bd 21, 4. Auflage. Weinheim: Verlag Chemie; 1982.
- [75] Bayer AG. Datenblattsammlung Silopren. Leverkusen: Geschäftsbereich Anorganische Chemikalien; 1992.
- [76] Bayer AG, Goldschmitt, Wackerchemie GmbH. Silicone – Chemie und Technologie. Essen: Vulkan-Verlag; 1989.
- [77] Ackermann J, Damrath V. Chemie und Technologie der Silicone II. *Chemie in unserer Zeit*. 1989; 23: 86-95.
- [78] Herrmann G, Nimtz F, Faulhaber H. Hochleistungsfähige Kautschukmischungen durch Verstärkung mit Silica-Aerogelen. *Kautschuk Gummi Kunststoffe*. 1996; 49: 289-292.
- [79] Hansen J. Verfahrenstechnische Optimierung einer Apparatur zur Herstellung poröser Kunststoffträger. TU-Braunschweig: Experimentelle Studienarbeit; 1997.
- [80] Liepe F, Möckel HO. Untersuchungen zum Stoffvereinigen in flüssiger Phase. *Chem Tech*. 1976; 28: 205-209.

- [81] Plett V. Skalierung, bzw. Neukonstruktion einer Apparatur zur Herstellung poröser Kunststoffträger zur Immobilisierung von Mikroorganismen. TU-Braunschweig: Konstruktive Studienarbeit; 1997.
- [82] Dialer K, Onken U, Leschonski. Grundzüge der Verfahrenstechnik und Reaktionstechnik. München: Carl Hanser Verlag; 1986.
- [83] Keil F. Diffusion und chemische Reaktion in der Gas/Feststoff-Katalyse – Eine Übersicht. Chem Technik. 1993; 45: 437-447.
- [84] Jost W. Fortschritte der physikalischen Chemie, Band 1: Methoden der Messung und Auswertung. Darmstadt: Verlag Dr. Diertich Steinkopff; 1957.
- [85] Chmiel H. Bioprozeßtechnik. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1991
- [86] Aynsley M., Ward A.C.und Wright A.R. A Mathematical Model for the Growth of Mycelial Fungi in Submerged Culture. Biotechnology and Bioengineering. 1990; 35: 820-830.
- [87] Bailey J.E.und Ollis D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, Second Edition. New York: McGraw-Hill Book Company; 1987.
- [88] Aiba S, Nagatani M, Furuse H. Some Analysis of Lag Phase in the Growth of Microbial Cells. J Ferment Technol. 1967; 45: 175-188.
- [89] Pruitt KM, Kamau DN. Mathematical models of bacterial growth, inhibition and death under combined stress conditions. Journal of Industrial Microbiology. 1993; 12: 221-231.
- [90] Pirt SJ. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. Proc Royal Soc B London. 1965; 163: 224-231.
- [91] Aiba S, Nagai S, Endo I, Nishizawa Y. A Dynamical Analysis of Microbial Growth. AIChE Journal. 1969; 15: 624-626.
- [92] Jones JE, Walker SJ. Advances in modelling microbial growth. Journal of Industrial Microbiology. 1993; 12: 200-205.
- [93] Marr AG, Nilson EH, Clark DJ. The Maintenance Requirement of Escherichia Coli. Annals of the New York Science. 1963; 102: 536-548.
- [94] Heijnen SJ. Thermodynamics of microbial growth and its implications for process design. Tibtech. 1994; 12: 483-492.
- [95] Zeng AP, Deckwer WD. A Kinetik Model for Substrate and Energy Consumption of Microbial Growth under Substrate-Sufficient Conditions. Biotechnol Prog. 1995; 11: 71-79.
- [96] Stewart PS. A Model of Biofilm Detachment. Biotechnol and Bioengineering. 1993; 41: 111-118.
- [97] Monbouquette HG, Ollis DF. A Structured Model for Immobilized Cell Kinetics. Annals New York Academy of Sciences.

- [98] de Gooijer CD, Wijffels RH, Tramper J. Growth and substrate consumption of nitrobacter agilis cells immobilized in carrageenan: Part 1. Dynamic modeling. Biotechnology and Bioengineering. 1991; 38: 224-231.
- [99] Brunke H. Kinetische Untersuchungen von freien und an porösen Siliconträgern adsorbierten Nitritoxidierern. Wolfenbüttel: Diplomarbeit; 1998.
- [100] Wijffels RH, de Gooijer CD, Kortekaas S, Tramper J. Growth and substrate consumption of Nitrobacter agilis cells immobilized in carrageenan. Part 2. Model evaluation. 1991; 38: 232-240.
- [101] Marsal D. Finite Differenzen und Elemente. Berlin: Springer-Verlag; 1989.
- [102] Henzler HJ. Verfahrenstechnische Auslegungsunterlagen für Rührbehälter als Fermenter. Düsseldorf: VDI-Verlag; 1983; VDI-Bericht Nr. 470: 515-526.
- [103] Newman JS. Electrochemical systems, Prentice-Hall, Englewood Cliff, New Jersey, 1973.
- [104] Wise DL, Houghton G. The diffusion coefficients of ten slightly soluble gases in water at 10-60°C. Chem Eng Sci. 1966; 21:999-1010.
- [105] Hitchman ML. Chemical Analysis, Volume 49: Measurement of dissolved oxygen. New York: John Wiley & Sons; 1978.
- [106] Hübschmann U, Links E. Tabellen zur Chemie. Mannheim: Handwerk und Technik; 1990.

9. Steuerdatei und Programmlisting

Das in den Kapitel 5.2 und 5.3 genutzte Programm wurde in der Programmiersprache C (ANSI) geschrieben und besteht aus einer Steuerdatei und dem eigentlichen Programmlisting, daß aus Gründen der Übersichtlichkeit in mehrere Include-Dateien aufgespalten wird.

Im Kopf der Steuerdatei wird die Anzahl der Kompartimente und deren Parameter festgelegt. Die Kompartimentnummer zählt zu den Parameter. An die Ausgabedatei wird automatisch die Extension “.dat” angehängt. Sollen Parameterwerte durch Variation optimiert werden, sucht das Programm nach gleichnamigen Dateien mit der Extension “.tab”. Gleiche Parameternummern besagen, daß die Ergebnisse in einer Summensatzdatei abgespeichert wird, deren Name aus den gleichlautenden Teilen der Kompartimente gebildet wird.

Beispiel: “bioaktiv” und “biotot” besitzen beide die Kompartimentnummer 1. Aus den Namen wird die Datei “bio” gebildet, die als bio.dat die Ergebnisse aufnimmt und als bio.tab die Vergleichswerte für die Optimierung zur Verfügung stellt.

Soll ein Parameter durch das Programm variiert werden, so ist in der Steuerdatei hinter dem Parameterwert die Bezeichnung “VAR” einzufügen, gefolgt vom oberen und unteren Grenzwert.

Die einzelnen Parameter sind mit einer kurzen Erklärung in Tabelle 9-1 dargestellt.

Das Programm selbst wird nach dem compilieren mit nur einem Argument gestartet. Hierbei handelt es sich um den Pfad und den Namen der Steuerdatei.

Tabelle 9-1 Erläuterung der Steuerdatei

Anzahl der Kompartimente	Anzahl der Kompartimente
Anzahl der Parameter	Anzahl der Parameter
Ausgabedatei	Erster Namensbestandteil der Ausgabedatei und der zur Optimierung notwendigen Datei experimentell ermittelter Werte
Kompartimentnummer	Dient der Verknüpfung zweier oder mehrerer Kompartimente, die z.B. experimentell nur als ein gemeinsamer Wert bestimmt werden können (z.B. Biomasse)
Dmatrix	Diffusionskoeffizient in der Trägermatrix
Dwasser	Diffusionskoeffizient in der wäßrigen Phase
Startmatrix	Startkonzentration in der Matrix
Startwasser	Startkonzentration in der wäßrigen Phase
Adsorptionsfaktor	Faktor der das Verhältnis von Adsorption zu Desorption bei einem bestehenden Gradienten beschreibt (Normal = 1.0)
Labyrinthfaktor der Poren	Labyrinthfaktor des Porensystems im Träger
Formfaktor	Formfaktor für den porösen Träger (Kugel = 2)
Maxzeit	Gesamte zu berechnende Versuchsdauer
Zeitschritt	Normale Schrittweite in Zeitrichtung
Kleinster Zeitschritt	Kleinster Wert des zeitlichen Schritts in Falle

	einer Verkleinerung
Maxlaenge	Im Falle einer Kugel der Trägerradius
Raumschritte	Anzahl der räumlichen Berechnungspunkte
Grenzfilm	Stärke des laminaren Grenzfilms (muß von 0 verschieden sein)
Schreibintervall	Zeitintervall an dem in die Resultatdateien geschrieben werden soll
Labyrinthfaktormatrix	Labyrinthfaktor der Matrix
Anzahl der Perlen; VolumendesReaktors; Dateiname	Anzahl der Trägerpartikel, dem Volumen des Reaktors sowie dem Namen der Datei, die die K _{La} -Werte enthält
Anzahl der Flüsse; Dateiname	Anzahl der Zuflüsse sowie dem Namen der Dateien, die die Flußraten beinhalten
Anzahl der Eingänge; Dateiname; Kompartiment	Anzahl der eingehenden Kompartimente, den Namen der Dateien, die die Konzentration des Kompartiments beinhaltet sowie der Kompartimentnummer dem dieser Eingang zugeordnet ist
Mymax	Maximale Wachstumsrate [h ⁻¹]
Kill	Wartungskoeffizient [mol/(kg *s)]
Knitrit	Sättigungskonstante für Nitrit [mol/m ³]
Ksauerstoff	Sättigungskonstante für Sauerstoff [mol/m ³]
Ysauerstoff/biomasse	Ausbeutekoeffizient [mol/kg]
Ynitrit/biomasse	Ausbeutekoeffizient [mol/kg]
Ynitrat/biomasse	Ausbeutekoeffizient [mol/kg]
Porenvolumen	Porenvolumen des Trägers [-]

9.1. STEUERDATEI

```

Anzahl der Kompartimente = 5
Anzahl der Parameter = 7

[Parameter]
[Kompartiment 0]
Ausgabedatei = bioaktiv
Kompartimentnummer = 1
Dmatrix = 0.0
Dwasser = 3.0e-13
Startmatrix = 0.0
Startwasser = 0.004
Adsorptionsfaktor = 1.0
labyrinthfaktorderporen = 1.0e5

[Kompartiment 1]
Ausgabedatei = biotot
Kompartimentnummer = 1
Dmatrix = 0.0
Dwasser = 3.0e-13
Startmatrix = 0.0
Startwasser = 0.0
Adsorptionsfaktor = 1.0
labyrinthfaktorderporen = 1.0e5

```

```

[Kompartiment 2]
Ausgabedatei = o2
Kompartimentnummer = 2
Dmatrix = 15.0e-9
Dwasser = 2.83e-9
Startmatrix = 0.25
Startwasser = 0.25
Adsorptionsfaktor = 1
labyrithfaktorderporen = 4.4

[Kompartiment 3]
Ausgabedatei = nitrit
Kompartimentnummer = 3
Dmatrix = 0.0
Dwasser = 2.2e-9
Startmatrix = 0.0
Startwasser = 0.0
Adsorptionsfaktor = 1
labyrithfaktorderporen = 4.4

[Kompartiment 4]
Ausgabedatei = nitrat
Kompartimentnummer = 4
Dmatrix = 0.0
Dwasser = 2.2e-9
Startmatrix = 0.0
Startwasser = 0.0
Adsorptionsfaktor = 1
labyrithfaktorderporen = 4.4

[Profil]
Formfaktor = 2
maxzeit = 1.1
zeitschritt = 0.0001
kleinsterzeitschritt = 0.0001
maxlaenge = 0.00085
raumschritte = 11
grenzfilm = 3.0e-5
schreibintervall = 1.0
labyrinthfaktormatrix = 1.0

[Reaktor]
AnzahlDerPerlen = 1440
VolumendesReaktors = 320e-6
Dateiname = c:\compiler\turboc\bin\Kla.dat

[Fluss]
AnzahlDerFluesse = 1
Dateiname = c:\compiler\turboc\bin\Fluss.dat

[Eingang]
AnzahlDerEingaenge = 2
Dateiname = c:\compiler\turboc\bin\No2ein.dat
Kompartiment = 3
Fluss = 1
Dateiname = c:\compiler\turboc\bin\No3ein.dat
Kompartiment = 4
Fluss = 1

[Biologie]
mymax = 0.075
maintenance = 2.682e-3
Knitrit = 0.4
Ksauerstoff = 0.009
Ysauerstoff/biomasse = 862.07
Ynitrit/biomasse = 1724.14
Ynitrat/biomasse = 1724.14
porenvolumen = 0.70

```


9.2. PROGRAMMLISTING

Main.c

```
/* Programm zur Loesung partieller Differentialgleichungen
   parabolische Anfangsrandwertaufgabe
   implicite Methode

/* Einbindung von Dateien und Bibliotheken*/

#include <stdio.h>
#include <math.h>
#include <errno.h>
#include <string.h>
#include <stdlib.h>

#define FELDA 16
/* FeldA sollte größer gleich Anzahl der Kompartimente + 1 sein */
#define FELDB 25
/* FeldB sollte größer gleich Anzahl der Raumschritte + 1 sein */
#define FELDC 2
/* FeldC beschreibt die Zustände "Alt und Neu */

/* Globale Variablen*/

/* Struktur mit Optimierungsdaten */

struct struct_Opti
{
    float startwert;
    int boolean;
    float obererWert,
        untererWert;
    char textfeld[80];
};

/* Struktur f r Informationen */

struct struct_Infos
{
    int parameter;          /* Anzahl der Parameter */
    int biologie;           /* Position ab der die Biologiedaten beginnen */
    int profil;             /* Position ab der die Profildaten beginnen */
    int reaktor;            /* Position ab der die Reaktordaten beginnen */
    int fluss;              /* Position ab der die Flussbeziehungen beginnen */
    int eingang;            /* Position ab der die Eingangsbeziehungen beginnen */
    int paraMax;            /* maximale Anzahl von Parametern */
    int varMax;             /* maximale Anzahl von variablen Parametern */
    int varPosition[200];   /* Variablenwerte ? */
};

char dateinamen[15][80];
struct struct_Opti s_parameter[200]; /* 200 Felder des Typs struct_Opti */
struct struct_Infos informationen;   /* 1 Feld des Typs struct_Infos */

/* Include-Dateien */

#include <einlesen.c>
#include <reaktion.c>
#include <reaktor.c>
#include <profil.c>
#include <abweich.c>
#include <vergleic.c>
#include <optimier.c>

/* Hauptprogramm*/
main(int argc, char *argv[])
```

```

{
float quadrat; /* Abweichungswert der Optimierung */
int steuerdatei_fehler;

if ( argc < 2 )
{
printf("Bitte den Pfadnamen der Steuerdatei angeben! \n");
return;
}

/* Auslesen der Steuerdatei */

steuerdatei_fehler = steuerdateiLesen(*(argv+1));

if (steuerdatei_fehler == 1)
{
printf("Bitte den Pfadnamen zur Steuerdatei berpr fen \n");
exit (0);
}

/* Abfrage der Anzahl zu optimierender Parameter und deren Auswirkung */

if (informationen.varMax == 0)
{
/* Keine abzusch,tzenden Parameter */

quadrat = vergleich();
}
else
{
if (informationen.varMax == 1)
{
/* Ein variabler Parameter */

informationen.paramax++;
informationen.varMax++;
informationen.varPosition[1] = informationen.paramax;
s_parameter[informationen.paramax].startwert = 2.0;
s_parameter[informationen.paramax].boolean = 1;
s_parameter[informationen.paramax].obererWert = 3.0;
s_parameter[informationen.paramax].untererWert = 1.0;
optimierung ();
}
else
{
/* mehrere variable Parameter */
optimierung ();
}
}
return 0;
}

```

INCLUDE einlesen.c

```

/* Auslesen der Steuerdatei */

int steuerdateiLesen(char *ini_name); /* Name der Steuerdatei */

/*-----
steuerdatei
Einlesen der Parameter der Steuerdatei
-----*/

int steuerdateiLesen(char *ini_name)

{

```

```

FILE *lesen;           /* File-Zeiger */
long laenge;           /* Laenge des Dateiinhalts */

/* Definition von Zeigervariablen f r das Auslesen */

char *ptrToken = NULL,
    *ptrTokenTemp = NULL,
    *ptrDateiPuffer,
    *ptrTemp1 = NULL,
    *ptrTemp2 = NULL,
    *ptrTemp3 = NULL,
    *ptrErgebnisStrings = NULL,
    *ptrKommentar = NULL;

/* Hilfszeiger f r Zahlen */

char *ptrZahlen = "-0123456789";
char hilfe[80];
int i = 0,
    j = 0,
    k = 0,
    varZaehler = 0,
    parameterZaehler = 0;
float floatTemp = 0.0;

if ((lesen = fopen(ini_name, "rt")) == NULL)
{
    return 1;
}

ptrDateiPuffer = calloc(3000, sizeof(char));

if ((fseek(lesen, 0, SEEK_END))!=NULL)
{
    puts("Probleme mit der File-Gr"ae \n");
    return;
}

fseek(lesen, 0L, SEEK_END);
laenge = ftell(lesen);
if (laenge >65534)
{
    puts("Steuerdatei ist zu gross");
    return;
}

fseek(lesen, SEEK_SET, 0);

fread(ptrDateiPuffer, laenge, 1, lesen);
ptrDateiPuffer[laenge] = '\0';

ptrToken = strtok(ptrDateiPuffer, "=\n");
while (ptrToken)
{
    ptrKommentar = strstr(ptrToken, "(");
    if (ptrKommentar)
    {
        laenge = strspn(ptrToken, " ");
        ptrErgebnisStrings = ptrToken+laenge+1;
        ptrTemp1 = strstr(ptrErgebnisStrings, "]");
        ptrTemp2 = strstr(ptrErgebnisStrings, " ");
        if (ptrTemp2 != NULL)
        {
            ptrTemp3 = strchr(ptrErgebnisStrings, ' ');
            *ptrTemp3 = '\0';
        }
        if (ptrTemp1 != NULL)

```

```

    {
        ptrTemp3 = strstr(ptrErgebnisStrings, "]");
        *ptrTemp3 = '\0';
    }
    if (strcmp(ptrErgebnisStrings, "Parameter") == 0) informationen.parameter =
parameterZaehler;
    if (strcmp(ptrErgebnisStrings, "Biologie") == 0) informationen.biologie =
parameterZaehler;
    if (strcmp(ptrErgebnisStrings, "Profil") == 0) informationen.profil = parameterZaehler;
    if (strcmp(ptrErgebnisStrings, "Reaktor") == 0) informationen.reaktor = parameterZaehler;
    if (strcmp(ptrErgebnisStrings, "Fluss") == 0) informationen.fluss = parameterZaehler;
    if (strcmp(ptrErgebnisStrings, "Eingang") == 0) informationen.eingang = parameterZaehler;

    if (!ptrTemp1)
    {
        ptrKommentar = strtok(NULL, "]");
        if (ptrKommentar)
        {
            ptrToken = (ptrKommentar+1);
        }
    }
}

if ((ptrErgebnisStrings = strpbrk(ptrToken, ptrZahlen))!= NULL)
{
    parameterZaehler ++;
    floatTemp = atof(ptrErgebnisStrings);
    s_parameter[i].startwert = floatTemp;
    s_parameter[i].boolean = 0;
    i = i+1;
}

if (ptrTokenTemp = strstr(ptrToken, "VAR"))
{
    i--;
    s_parameter[i].boolean = 1;
    informationen.varPosition[k] = i;
    ptrToken = strtok(NULL, " \n");
    s_parameter[i].obererWert = atof(ptrToken);
    ptrToken = strtok(NULL, " \n");
    s_parameter[i].untererWert = atof(ptrToken);
    varZaehler ++;
    i++;
    k++;
}

if (ptrTokenTemp = strstr(ptrToken, "Dateiname"))
{
    parameterZaehler ++;
    ptrToken = strtok(NULL, "\n\t");
    laenge = strspn(ptrToken, " ");
    strcpy (s_parameter[i].textfeld, &ptrToken[laenge]);
    s_parameter[i].boolean = 0;
    i++;
}

if (ptrErgebnisStrings = strstr(ptrToken, "Ausgabedatei"))
{
    ptrToken = strtok(NULL, "\n\t");
    laenge = strspn(ptrToken, " ");
    ptrErgebnisStrings = &ptrToken[laenge];
    strcpy (*(dateinamen+j), ptrErgebnisStrings);
    j = j+1;
}

ptrToken = strtok(NULL, " \n");

```

```

}

fclose (lesen);

informationen.varMax = varZaehler;
informationen.paramMax = parameterZaehler;

free (ptrDateiPuffer);
return 0;
}

```

INCLUDE reaktion.c

```

void reaktion (      float konz[],
                  float ergebnis[],
                  int perle);

/* -----
   reaktion
   Unterprogramm zur Berechnung der Konzentrationsaenderung durch
   Reaktion sowie des Wachstums der Biomasse
   ----- */

void reaktion (      float konz[],
                  float ergebnis[],
                  int perle)
{
    float my = 0.0,
          mymax = 0.0,
          Ks1 = 0.0,
          Ks2 = 0.0,
          maintfaktor = 0.0,
          monod = 0.0,
          porenraum,
          y[15],
          Porenfaktor;

    int i = 0,
        position_bio = 0,
        position_profil;

    for (i = 0; i <= 14; i++) y[i] = 0.0;

    position_bio = informationen.biologie;

    mymax = s_parameter[position_bio].startwert;
    Ks1 = s_parameter[position_bio+2].startwert;
    Ks2 = s_parameter[position_bio+3].startwert;
    y[1] = s_parameter[position_bio+4].startwert;
    y[2] = s_parameter[position_bio+5].startwert;
    y[3] = s_parameter[position_bio+6].startwert;
    maintfaktor = s_parameter[position_bio+1].startwert * 3600.0 / y[2];
    porenraum = s_parameter[position_bio+7].startwert * 1000.0 / 5.0;

    if (perle)
    {
        Porenfaktor = ((porenraum - (konz[0] + konz[1])) / porenraum) * ((porenraum - (konz[0] +
konz[1])) / porenraum);
        if ((konz[0] + konz[1]) < porenraum)
        {
            Porenfaktor = 1.0;
        }
        else
        {
            Porenfaktor = 0.0;
        }
    }
}

```

```

    }
    else
    {
        Porenfaktor = 1.0;
    }

    monod = konz[3] / (konz[3] + Ks1)*konz[2]/(konz[2]+Ks2);
    my = mymax * monod * Porenfaktor;

    if ((my < 0.0) || (konz[2] < 0.0) || (konz[3] < 0.0))
    {
        my = 0.0;
    }

    if ((my < 0.0) || (konz[2] < 0.0) || (konz[3] < 0.0))
    {
        monod = 0.0;
    }

    ergebnis[0] = konz[0] * (my - maintfaktor * (1-monod));
    ergebnis[1] = konz[0] * maintfaktor * (1-monod);
    ergebnis[2] = -konz[0] * y[1] * (my + monod * maintfaktor);
    ergebnis[3] = -konz[0] * y[2] * (my + monod * maintfaktor);
    ergebnis[4] = konz[0] * y[3] * (my + monod * maintfaktor);

    return;
}

```

INCLUDE reaktor.c

```

void lesen ( FILE *Dateizeiger,

            float *ergebnis,
            float t,
            float altezeit);

void lesen ( FILE *Dateizeiger,
            float *ergebnis,
            float t,
            float altezeit)

{
    static char *ptrZahlen = "-0123456789";
    char hilf[80];
    char *hilf1 = NULL,
        *hilf2 = NULL;

    while (t > altezeit)
    {
        if (eof (Dateizeiger))
        {
            fgets(hilf, 80, Dateizeiger);

            hilf1 = strtok(hilf, "\t\n");
            hilf2 = strpbrk(hilf1, ptrZahlen);
            if (hilf2 && hilf1)
            {
                ergebnis[0] = atof(hilf2);
                altezeit = ergebnis[0];
            }
            else
            {
                altezeit = t;
            }

            hilf1 = strtok(NULL, "\t\n");
            hilf2 = strpbrk(hilf1, ptrZahlen);
        }
    }
}

```

```

        if (hilf2 && hilf1)
        {
            ergebnis[1] = atof(hilf2);
        }
        else
        {
            altezeit = t;
        }
    }
    else
    {
        altezeit = t;
    }
}
}

void reaktor (float t,
float zeitintervall,
float raumschritt,
int *initial,
int *ende,
float bulkneu[],
float bulkalt[],
float konzperlende[],
float externAds[],
float externDes[]);

/* -----
           reaktor
    Unterprogramm zur Berechnung der Reaktorkonzentration
    -----
*/
void reaktor (float t,
float zeitintervall,
float raumschritt,
int *initial,
int *ende,
float bulkneu[],
float bulkalt[],
float konzperlende[],
float externAds[],
float externDes[])

{
    int intvar = 0,
    j = 0,
    m = 0,
    n = 0,
    q = 0,
    p = 0,
    s = 0,
    eingaenge = 0,
    fluesse = 0,
    maxsubs = 0,
    anzahlDerPerlen = 0,
    nummmerEingang[15];

    float floatvar[15],
    flaeche = 0.0,
    maxlaenge = 0.0,
    volumen = 0.0,
    ergebnis[2],
    zeitende;

    /* Staticvariablen: gelten nur lokal und behalten ihren Werte */
    /* zwischen zwei Funktionsaufrufen */

    static FILE *Kla[1],
    *Fluss[5],

```

```

        *Eingang[15];

static long   altposkla,
              altposfluss[5],
              altposeingang[15];

static float  eingangskonz[15][5],
              kla1,
              kla2,
              fluss1[5],
              fluss2[5],
              eingang1[15],
              eingang2[15],
              maxloesung[15],
              begasung[15],
              aenderung[15],
              flussbilanz[15],
              zeitkla1,
              zeitkla2,
              zeitfluss1[5],
              zeitfluss2[5],
              zeiteingang1[15],
              zeiteingang2[15],
              umsatzperle[15],
              adsorption[15],
              desorption[15];

static int    steuermatrix[15][2];

maxsubs = floor(s_parameter[0].startwert);

m = informationen.reaktor;
n = informationen.fluss;
p = informationen.eingang;
q = informationen.profil;

fluesse = floor(s_parameter[n].startwert);
eingaenge = floor(s_parameter[p].startwert);
zeitende = floor(s_parameter[q+1].startwert);

anzahlDerPerlen = floor(s_parameter[m].startwert);
volumen = s_parameter[m+1].startwert;

/* Abfrage, ob das Unterprogramm zum ersten Mal aufgerufen wurde */

if (*initial == 1)
{
    for (j = 0; j < eingaenge; j++)
    {
        steuermatrix[j][0] = floor(s_parameter[p+3*j+2].startwert);
        steuermatrix[j][1] = floor(s_parameter[p+3*j+3].startwert-1);

        if ((Eingang[j] = fopen(s_parameter[p+3*j+1].textfeld,"rt")) == NULL)
        {
            printf("Bitte berpr fen Sie den Pfadnamen der Eingangskonzentration in der Steuerdatei
\n");
            exit (0);
        }
    }
}

/* mffnen der Flussdateien */

for (j = 0; j < fluesse; j++)
{
    if ((Fluss[j] = fopen(s_parameter[n+j+1].textfeld,"rt")) == NULL)
    {
        printf("Bitte berpr fen Sie den Pfadnamen der Fluádatei in der Steuerdatei \n" );
    }
}

```



```

        exit (0);
    }
}

/* Öffnen der kla-Datei */

if ((Kla[0] = fopen(s_parameter[m+2].textfeld,"rt")) == NULL)
{
    printf("Bitte überprüfen Sie den Pfadnamen der Kladei in der Steuerdatei \n");
}

for (j = 0; j < fluesse; j++)
{
    for (s = 0; s < maxsubs; s++)
    {
        eingangskonz[j][s] = 0.0;
    }
}

/* 1. Auslesen der Kla-Datei */

zeitklal = 0.0;
klal = 0.0;

ergebnis[0] = zeitklal;
ergebnis[1] = klal;

altposkla = ftell(Kla);

lesen (*Kla, ergebnis, t, -1.0);
altposkla = ftell(Kla);

zeitklal = ergebnis[0];
klal = ergebnis[1];

if (altposkla < 0)
{
    zeitkla2 = zeitende;
    kla2 = ergebnis[1];
}
else
{
    lesen (*Kla, ergebnis, t, -1.0);
    altposkla = ftell(Kla);

    if (ergebnis[0] > zeitklal)
    {
        zeitkla2 = ergebnis[0];
        kla2 = ergebnis[1];
    }
    else
    {
        zeitkla2 = zeitende;
        kla2 = ergebnis[1];
    }
}

/* 1. Auslesen der Flussdateien */

for (s = 0; s < fluesse; s++)
{
    zeitfluss1[s] = 0.0;
    fluss1[s] = 0.0;

    ergebnis[0] = zeitfluss1[s];
    ergebnis[1] = fluss1[s];

    altposfluss[s] = ftell(Fluss[s]);
}

```

```

    lesen (*Fluss+s, ergebnis, t, -1.0);
    altposfluss[s] = ftell(Fluss[s]);

    zeitfluss1[s] = ergebnis[0];
    fluss1[s] = ergebnis[1];

    if (altposfluss[s] < 0)
    {
        zeitfluss2[s] = zeitende;
        fluss2[s] = ergebnis[1];
    }
    else
    {
        lesen (*Fluss+s, ergebnis, t, -1.0);
        altposfluss[s] = ftell(Fluss[s]);

        if (ergebnis[0] > zeitfluss1[s])
        {
            zeitfluss2[s] = ergebnis[0];
            fluss2[s] = ergebnis[1];
        }
        else
        {
            zeitfluss2[s] = zeitende;
            fluss2[s] = ergebnis[1];
        }
    }
}

/* 1. Auslesen der Eingangskonz.-Dateien */

for (s = 0; s < eingaenge; s++)
{
    zeiteingang1[s] = 0.0;
    eingang1[s] = 0.0;

    ergebnis[0] = zeiteingang1[s];
    ergebnis[1] = eingang1[s];

    altposeingang[s] = ftell(Eingang[s]);
    lesen (*Eingang+s, ergebnis, t, -1.0);
    altposeingang[s] = ftell(Eingang[s]);

    zeiteingang1[s] = ergebnis[0];
    eingang1[s] = ergebnis[1];

    if (altposeingang[s] < 0)
    {
        zeiteingang2[s] = zeitende;
        eingang2[s] = ergebnis[1];
    }
    else
    {
        lesen (*Eingang+s, ergebnis, t, -1.0);
        altposeingang[s] = ftell(Eingang[s]);

        if (ergebnis[0] > zeiteingang1[s])
        {
            zeiteingang2[s] = ergebnis[0];
            eingang2[s] = ergebnis[1];
        }
        else
        {
            zeiteingang2[s] = zeitende;
            eingang2[s] = ergebnis[1];
        }
    }
}

```

```

    eingangskonz[(steuermatrix[s][0])][(steuermatrix[s][1])] = eingangl[s];
}
}

if (*ende == 1)
{
    for (j = 0; j < eingaenge; j++)
    {
        fclose (Eingang[j]);
    }
    for (j = 0; j < fluesse; j++)
    {
        fclose (Fluss[j]);
    }
    fclose (Kla);
}

*initial = 0;

/* Ende der Initialisierung */

/* Auslesen Kla-Datei */

if (t > zeitkla2)
{
    zeitklal = zeitkla2;
    klal = kla2;
    ergebnis[0] = zeitklal;
    ergebnis[1] = klal;

    fseek(Kla, altposkla, SEEK_SET);
    lesen (*Kla, ergebnis, t, zeitklal);
    altposkla = ftell(Kla);

    if (ergebnis[0] > t)
    {
        zeitkla2 = ergebnis[0];
        kla2 = ergebnis[1];
    }
    else
    {
        zeitkla2 = zeitende;
        kla2 = ergebnis[1];
    }
}

/* Auslesen Flussdateien */

for (s = 0; s < fluesse; s++)
{
    if (t > zeitfluss2[s])
    {
        zeitflussl[s] = zeitfluss2[s];
        flussl[s] = fluss2[s];

        ergebnis[0] = zeitflussl[s];
        ergebnis[1] = flussl[s];

        fseek(Fluss[s], altposfluss[s], SEEK_SET);
        lesen (*Fluss+s, ergebnis, t, zeitflussl[s]);
        altposfluss[s] = ftell(Fluss[s]);

        if (ergebnis[0] > t)
        {
            zeitfluss2[s] = ergebnis[0];
            fluss2[s] = ergebnis[1];
        }
    }
}

```

```

        else
        {
            zeitfluss2[s] = zeitende;
            fluss2[s] = ergebnis[1];
        }
    }
}

/* Auslesen der Eingangskonzentrations-Datei */

for (s = 0; s < eingaenge; s++)
{
    if (t > zeiteingang2[s])
    {
        zeiteingang1[s] = zeiteingang2[s];
        eingang1[s] = eingang2[s];
        ergebnis[0] = zeiteingang1[s];
        ergebnis[1] = eingang1[s];

        fseek(Eingang[s], altposeingang[s], SEEK_SET);
        lesen (*Eingang+s, ergebnis, t, zeiteingang1[s]);
        altposeingang[s] = ftell(Eingang[s]);

        if (ergebnis[0] > t)
        {
            zeiteingang2[s] = ergebnis[0];
            eingang2[s] = ergebnis[1];
        }
        else
        {
            zeiteingang2[s] = zeitende;
            eingang2[s] = ergebnis[1];
        }
        eingangskonz[(steuermatrix[s][0])][(steuermatrix[s][1])] = eingang1[s];
    }
}

maxloesung[0] = bulkalt[0];
maxloesung[1] = bulkalt[1];
maxloesung[2] = 0.25;
maxloesung[3] = bulkalt[3];
maxloesung[4] = bulkalt[4];

intvar = informationen.profil;
maxlaenge = s_parameter[intvar+4].startwert;
flaeche = (maxlaenge/2)*(maxlaenge/2)*4*3.1415926*anzahlDerPerlen;

for (s = 0; s < maxsubs; s++)
{
    adsorption[s] = bulkalt[s] * (-externAds[s]);
    if (konzperlende[s] < 140.0)
    {
        desorption[s] = konzperlende[s] * (-externDes[s]);
    }
    else
    {
        desorption[s] = konzperlende[s] * (-externAds[s]);
    }

    umsatzperle[s] = flaeche * (desorption[s] - adsorption[s]) * zeitintervall;
    begasung[s] = (maxloesung[s] - bulkalt[s]) * klal * zeitintervall;

    flussbilanz[s] = 0.0;

    for (j = 0; j < fluesse; j++)
    {
        flussbilanz[s] = flussbilanz[s] + (eingangskonz[s][j] - bulkalt[s]) * fluss1[j]
        *zeitintervall;
    }
}

```

```

    }
    bulkneu[s] = bulkalt[s] + flussbilanz[s] + umsatzperle[s] / volumen + begasung[s];
    konzperlende[s] = konzperlende[s] + umsatzperle[s] / (raumschritt * flaeche);
}

/* Freie Zellen: Aufruf des Unterprogramms Reaktion */

reaktion(bulkneu, aenderung, 0);

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
    bulkneu[s] = bulkneu[s] + aenderung[s]*zeitintervall;
}

return;
}

```

INCLUDE profil.c

```

float Diffusion (      float  laenge,
    float      xlauf,
    float      Dmatrix,
    float      Dh2o,
    float      labyrinthpore);

float Diffusion (      float  laenge,
    float      xlauf,
    float      Dmatrix,
    float      Dh2o,
    float      labyrinthpore)

{
    int i;
    float D;

    i = informationen.biologie;

    D = Dmatrix * s_parameter[i+7].startwert + Dh2o
        * (1-s_parameter[i+7].startwert);

    if (xlauf < (laenge - 0.0002))
    {
        D = Dmatrix * s_parameter[i+7].startwert
            + Dh2o / labyrinthpore * (1-s_parameter[i+7].startwert);
    }
    return D;
}

void Ereignis ();

void Ereignis ()
{
    /*
    if (((fabs(((floor(t/24.0))*24.0)-t)) < (1.0 * k * 1.0001) ) && (t > 1.0))
    {
        for (s = 0; s <= (maxsubs - 1); s++)
        {
            bulk[s][0] = konz_perl_start[s];
            bulk[s][1] = konz_perl_start[s];
            konzperl[s][1][0] = konz_perl_start[s];
            konzperl[s][1][1] = konz_perl_start[s];
        }
    }
    */
}

```

```

*/
}

void Schreiben (FILE *Bulkdateizeiger,
               int anzahlSumme,
               int inform[][15],
               float t,
               float konzperl[][FELDB][FELDC],
               int maxsubs,
               int anzaumschritte);

void Schreiben (FILE *Bulkdateizeiger,
               int anzahlSumme,
               int inform[][15],
               float t,
               float konzperl[][FELDB][FELDC],
               int maxsubs,
               int anzaumschritte)
{
    int i, j, p, nummer;
    float summe;

    printf ("t = %6.2f\t", t);
    printf ("%6.4f\t", konzperl[0][1][0]);

    for (j = 0; j <= maxsubs-1; j++)
    {
        printf ("%6.4f\t", konzperl[j][0][0]);
    }

    printf ("\n");

    for (j = 0; j <= maxsubs-1; j++)
    {
        fprintf (Bulkdateizeiger+j, "%6.2f\t", t);

        for (i = 0; i <= anzaumschritte; i++)
        {
            fprintf (Bulkdateizeiger+j,"%5.3f\t", konzperl[j][i][0]);
        }

        fprintf (Bulkdateizeiger+j, "\n");
    }

    for (nummer = 0; nummer <= anzahlSumme-1; nummer++)
    {
        fprintf (Bulkdateizeiger+(maxsubs+nummer), "%6.2f\t", t);
        summe = 0.0;

        for (p = 0; p <= maxsubs-1; p++)
        {
            if (inform[nummer][p] == 1) summe = summe + konzperl[p][0][0];
        }

        fprintf (Bulkdateizeiger+(maxsubs+nummer),"%5.3f\t", summe);
        fprintf (Bulkdateizeiger+(maxsubs+nummer), "\n");
    }
}

void profil (char dateiBerechnungBulk[][80], char dateiSummeBulk[][80], int anzahlSumme, int
inform[][15]);

/* -----
           profil
    Unterprogramm zur Berechnung des Konzentrationsprofils
    ----- */

```

```

void profil (char dateiBerechnungBulk[][80], char dateiSummeBulk[][80], int anzahlSumme, int
inform[][15])

{
    FILE *Bulkdateizeiger[FELDA];
    int i,
        j,
        n,
        s,
        p,
        nummer,
        anzahlParameter,
        maxsubs,
        anzaumschritte,
        initialisierung = 1,
        ende = 0;

    float formfaktor,
        zeitschritt_verkleinern,
        konzperl[FELDA][FELDB][FELDC],
        aenderung[FELDA],
        stoech[FELDA],
        konzentration[FELDA],
        konzperlende[FELDA],
        r,
        laenge,
        D[FELDA],
        Dh2o[FELDA],
        Dmatrix[FELDA],
        xlauf,test,
        t,
        h,
        k,
        x[FELDA][FELDB],
        y[FELDA][FELDB],
        m[FELDA][FELDB],
        a[FELDA][FELDB],
        bulk[FELDA][FELDC],
        l[FELDA][FELDB],
        b[FELDA][FELDB],
        c[FELDA][FELDB],
        d[FELDA][FELDB],
        C[FELDA][FELDB][FELDC],
        stoechfaktor[FELDA],
        konz_perl_start[FELDA],
        grenzfilm,
        schreibintervall,
        kleinster_zeitschritt,
        maxzeit,
        zeitschritt,
        maxlaenge,
        externDes[FELDA],
        externAds[FELDA],
        bulkneu[FELDA],
        bulkalt[FELDA],
        summe,
        labyrinthfaktormatrix,
        labyrinthpore[FELDA];

    i = informationen.profil;

    formfaktor = s_parameter[i].startwert;
    maxzeit = s_parameter[i+1].startwert;
    zeitschritt = s_parameter[i+2].startwert;

    k = zeitschritt;

    kleinster_zeitschritt = s_parameter[i+3].startwert;
    maxlaenge = s_parameter[i+4].startwert;
    anzaumschritte = s_parameter[i+5].startwert;

```

```

grenzfilm = -s_parameter[i+6].startwert;
schreibintervall = s_parameter[i+7].startwert;
labyrinthfaktormatrix = s_parameter[i+8].startwert;

anzahlParameter = floor(s_parameter[1].startwert);
maxsubs = s_parameter[0].startwert;

for (i = 0; i <= maxsubs-1; i++)
{
    if ((Bulkdateizeiger[i] = fopen(*(dateiBerechnungBulk+i), "wt")) == NULL)
    {
        printf("Probleme beim Öffnen der Resultatdateien \n");
        exit (0);
    }
}

for (i = 0; i <= anzahlSumme-1; i++)
{
    if ((Bulkdateizeiger[i+maxsubs] = fopen(*(dateiSummeBulk+i), "wt")) == NULL)
    {
        printf("Probleme beim Öffnen der Resultatdateien \n");
    }
}

for (s = 0; s <= (maxsubs - 1); s++)
{
    Dmatrix[s] = s_parameter[s * anzahlParameter + 3].startwert*3600.0
        * labyrinthfaktormatrix;

    Dh2o[s] = s_parameter[s * anzahlParameter + 4].startwert*3600.0;

    labyrinthpore[s] = s_parameter[s * anzahlParameter + 8].startwert;

/* Externe Grenzschiicht */
    externAds[s] = Dh2o[s] / grenzfilm;

/* plus Adsorptionsfaktor */
    externDes[s] = externAds[s] / s_parameter[s * anzahlParameter + 7].startwert;

    konz_perl_start[s] = s_parameter[s * anzahlParameter + 5].startwert;

    bulk[s][0] = s_parameter[s * anzahlParameter + 6].startwert;
    bulk[s][1] = bulk[s][0];

}

t = 0.0;
h = -maxlaenge/(anzraumschritte-1.0);
r = k/h/h;
laenge = maxlaenge;

/* Initialisierung der Matrizen f r Zeitschritt j und j+1 */

for (s = 0 ; s <= maxsubs-1; s++)
{
    for (i = 1 ;i <= anzraumschritte; i++)
    {
        konzperl[s][i][0] = konz_perl_start[s];
    }
}

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
    konzperl[s][0][0] = bulk[s][0];
}

/* ----- */

/* Beginn der Berechnung */

```



```

    while (t <= maxzeit)
    {
        if ((fabs(((floor(t/schreibintervall))*schreibintervall)-t)) < (1.0 * k * 1.0001) )
        {
            Schreiben (*Bulkdateizeiger, anzahlSumme, inform, t, konzperl, maxsubs, anzraumschritte);
        }

        zeitschritt_verkleinern = 0;
        formfaktor = formfaktor;
        h = -maxlaenge/(anzraumschritte-1.0);
        k = zeitschritt;
        r = k/h/h;
        laenge = maxlaenge;

/* Übergabe der Konzentrationswerte an einen Zwischenspeicher */

        for (s = 0; s <= maxsubs; s++)
        {
            for (i = 0; i <= anzraumschritte; i++)
            {
                konzperl[s][i][1] = konzperl[s][i][0];
            }
        }

/* Iteration um das Konzentrationsprofil mit der Reaktorkonzentration
   abzustimmen */

        do
        {

            if (zeitschritt_verkleinern)
            {
                k = k/2.0;
            }
            if (k < kleinstster_zeitschritt)
            {
                k = kleinstster_zeitschritt;
            }

            zeitschritt_verkleinern = 0;

            r = k/h/h;

/* Übergabe der Zwischenspeicherwerte an das Konzentrationsprofil */

            for (s = 0; s <= maxsubs; s++)
            {
                for (i = 0; i <= anzraumschritte; i++)
                {
                    konzperl[s][i][0] = konzperl[s][i][1];
                }
            }

/* ----- */

/* Lösung des linearen Gleichungssystems */
/* Die Matrix ist tridiagonal mit konstanten Koeffizienten */

            xlauf = laenge;

            for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
            {
                D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

                m[s][1] = 1 + D[s]*r/2.0 + formfaktor*D[s]*k/(xlauf*4.0*h) + (k * externDes[s]/(2.0*h)) -
                (k*externDes[s]*formfaktor)/(4.0 *xlauf);
            }
        }
    }

```

```

}

for (i = 1 ; i <= (anzraumschritte-2); i++)
{
  for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
  {
    D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

    b[s][i] = (-D[s]*r/2.0-formfaktor*D[s]*k/(4.0*xlauf*h));
  }

  xlauf = xlauf + h;

  for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
  {
    D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

    c[s][i] = (-D[s]*r/2+D[s]*formfaktor*k/(4.0*h*xlauf));
    l[s][i] = c[s][i] / m[s][i];
    a[s][i+1] = (1+D[s]*r);
    m[s][i+1] = a[s][i+1] -l[s][i]*b[s][i];
  }
}

i = anzraumschritte-1;
for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
  D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

  b[s][i] = (-D[s]*r/2.0-D[s]*formfaktor*k/(4.0*xlauf*h));
}
xlauf = xlauf + h;

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
  D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

  c[s][i] = (-D[s]*r);
  l[s][i] = c[s][i] / m[s][i];
  a[s][i+1] = (1+D[s]*r);
  m[s][i+1] = a[s][i+1] -l[s][i]*b[s][i];
}

/* Berechnung der D-Werte aus den Konzentrationen des alten Zeitschritts */

xlauf = laenge;
zeitschritt_verkleinern = 0;
for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
  konzentration[s] = konzperl[s][1][0];
}
reaktion(konzentration, aenderung, 1);

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
  D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

  y[s][1] = konzperl[s][2][0] * (D[s]*r/2.0
    + formfaktor*D[s]*k/(xlauf*4.0*h))
    + konzperl[s][1][0] * (1-D[s]*r/2.0 - formfaktor*D[s]*k/(xlauf*4.0*h)
    - externDes[s]*k/(2.0*h)
    + externDes[s]*formfaktor*k/(4.0*xlauf))
    + aenderung[s]*k
    + (bulk[s][0]+bulk[s][1])*(externAds[s]*k/(2.0*h)
    - externAds[s]*formfaktor*k/(4*xlauf));
}

```

```

}

for (i = 2 ; i <= anzraumschritte-1; i++)
{
    xlauf = xlauf + h;
    for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
    {
        konzentration[s] = konzperl[s][i][0];
    }
    reaktion(konzentration, aenderung, 1);

    for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
    {
        D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

        d[s][i] =
            konzperl[s][i+1][0] *(D[s]*r/2.0
            + formfaktor*D[s]*k/(4.0*xlauf*h))
            + konzperl[s][i][0] * (1-D[s]*r)
            + konzperl [s][i-1][0] * (D[s]*r/2.0-D[s]*formfaktor*k/(4.0*xlauf*h))
            + aenderung[s]*k;
        y[s][i] = d[s][i]-l[s][i-1]*y[s][i-1];
    }
}

i = anzraumschritte;

xlauf = xlauf + h;
for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
    konzentration[s] = konzperl[s][i][0];
}
reaktion(konzentration, aenderung, 1);

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
    D[s] = Diffusion (laenge, xlauf, Dmatrix[s], Dh2o[s], labyrinthpore[s]);

    d[s][i] = (D[s]*r)*konzperl[s][i-1][0]
        + (1-D[s]*r)*konzperl[s][i][0]
        + aenderung[s]*k;
    y[s][i] = d[s][i]-l[s][i-1]*y[s][i-1];
}

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
    x[s][i] = y[s][i]/m[s][i];
    konzperl [s][i][0] = x[s][i];
}

for (i = (anzraumschritte-1); i >= 1; i--)
{
    for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
    {
        x[s][i] = (y[s][i] - b[s][i] * x[s][i+1])/m[s][i];
        konzperl[s][i][0] = x[s][i];
    }
}

Ereignis ();

for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
{
    konzperl[s][0][0] = bulk[s][0];
    konzperl[s][0][1] = bulk[s][1];
    bulkalt[s] = bulk[s][0];
    konzperlende[s] = konzperl[s][1][0];
}

```

```

    reaktor (t, k, h, &initialisierung, &ende, bulkneu, bulkalt, konzperlende, externAds,
externDes);

    for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
    {
        bulk[s][1] = bulkneu[s];
        konzperl[s][1][1] = konzperlende[0];
    }

    for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
    {
        for (i = 0; i <= anzaumschritte; i++)
        {
            if (konzperl[s][i][0] <= (0.0))
            {
                zeitschritt_verkleinern = 1;
            }
            if ((konzperl[s][i][0] < (0.99 * konzperl[s][i][1])) || (konzperl[s][i][0] > (1.01 *
konzperl[s][i][1])))
            {
                zeitschritt_verkleinern = 1;
            }
        }
    }

    while (zeitschritt_verkleinern && (k > (kleinster_zeitschritt*1.1)));
    for (s = 0; s <= maxsubs-1; s++)
    {
        bulk[s][0] = bulk[s][1];
    }
    t = t + k;
}

ende = 1;

reaktor (t, k, h, &initialisierung, &ende, bulkneu, bulkalt, konzperlende, externAds,
externDes);

for (i = 0; i <= maxsubs-1+anzahlSumme; i++)
{
    fclose (Bulkdateizeiger[i]);
}
return;
}

```

INCLUDE abweich.c

```

float abweichung (    char dateiExperiment[][80],
                    char dateiBerechnung[][80],
                    int max_kompartimente);

/* -----
                        Abweichung
-----*/

float abweichung (    char dateiExperiment[][80],
                    char dateiBerechnung[][80],
                    int max_kompartimente)

```

```

{
FILE *lesenexp[15],
  *lesenber[15];
int i,
  j;
float xexp,
  yexp,
  xber,
  yber,
  xberalt,
  yberalt,
  quadrat[20],
  faktor,
  yextra,
  quadrat_abweichung;
char *hilfexp = NULL,
  *hilfber = NULL;

hilfexp = calloc(20, sizeof(char));
hilfber = calloc(20, sizeof(char));

for (i = 0; i < max_kompartimente; i++)
{
if ((lesenexp[i] = fopen(*(dateiExperiment+i), "rt")) == NULL)
{
printf("Experimentdatei kann nicht ge"ffnet werden \n", *(dateiExperiment+i));
exit (0);
}
if ((lesenber[i] = fopen(*(dateiBerechnung+i), "rt")) == NULL)
{
printf("Berechnete Datei kann nicht ge"ffnet werden \n", *(dateiBerechnung+i));
exit (0);
}
}

for (j = 0; j <= 1; j++)
{
quadrat[j] = 0.0;

faktor = 1.0;
xberalt = 0.0;
yberalt = 0.0;

/* 1. Auslesen */

fscanf (lesenexp[j], "%s", hilfexp);
xexp = atof (hilfexp);

fscanf (lesenexp[j], "%s", hilfexp);
yexp = atof (hilfexp);

fscanf (lesenber[j], "%s", hilfber);
xber = atof (hilfber);

fscanf (lesenber[j], "%s", hilfber);
yber = atof (hilfber);

/* 1. Šberpr fung */

if (xexp == xber)
{
quadrat[j] = quadrat[j] + (yexp - yber) * (yexp - yber) * faktor;
}
else
{
if (xexp < xber)
{
printf ("experimentelle Werte liegen auėerhalb des Meėbereichs \n");
}
}
}

```

```

if (xber < xexp)
{
    while (xber <= xexp)
    {
        xberalt = xber;
        if (feof(lesenber[j])) goto ende;
        fscanf (lesenber[j], "%s", hilfber);
        xber = atof (hilfber);

        yberalt = yber;
        fscanf (lesenber[j], "%s", hilfber);
        yber = atof (hilfber);
    }
    if (xber == xexp)
    {
        quadrat[j] = quadrat[j] + (yexp - yber) * (yexp - yber) * faktor;
    }
    if (xber > xexp)
    {
        yextra = (xexp - xberalt) * (yber - yberalt) / (xber - xberalt) + xber;
        quadrat[j] = quadrat[j] + (yextra - yexp) * (yextra - yexp) * faktor;
    }
}
}

/* Schleife */
while ((! feof(lesenber[j])) || (! feof(lesenexp[j])))
{
    if (feof(lesenexp[j])) goto ende;
    fscanf (lesenexp[j], "%s", hilfexp);
    xexp = atof (hilfexp);

    fscanf (lesenexp[j], "%s\n", hilfexp);
    yexp = atof (hilfexp);

    if (xexp == xber)
    {
        quadrat[j] = quadrat[j] + (yexp - yber) * (yexp - yber) * faktor;
    }
    else
    {
        if (xexp < xber)
        {
            yextra = (xexp - xberalt) * (yber - yberalt) / (xber - xberalt) + xber;
            quadrat[j] = quadrat[j] + (yextra - yexp) * (yextra - yexp) * faktor;
        }
        if (xber < xexp)
        {
            while (xber < xexp)
            {
                xberalt = xber;
                if (feof(lesenber[j])) goto ende;
                fscanf (lesenber[j], "%s", hilfber);
                xber = atof (hilfber);

                yberalt = yber;
                fscanf (lesenber[j], "%s", hilfber);
                yber = atof (hilfber);
            }
            if (xber == xexp)
            {
                quadrat[j] = quadrat[j] + (yexp - yber) * (yexp - yber) * faktor;
            }
            if (xber > xexp)
            {
                yextra = (xexp - xberalt) * (yber - yberalt) / (xber - xberalt) + xber;
                quadrat[j] = quadrat[j] + (yextra - yexp) * (yextra - yexp) * faktor;
            }
        }
    }
}
}

```

```

    }
    ende:
    fclose (lesenexp[j]);
    fclose (lesenber[j]);
}

quadrat_abweichung = 0.0;

for (j = 0; j <= max_kompartimente-1; j++)
{
    quadrat_abweichung = quadrat_abweichung + quadrat[j];
}

free (hilfber);
free (hilfexp);
return quadrat_abweichung;
}

INCLUDE vergleic.c

/* Šbergeordnete Programmroutine: 1. Profilberechnungsroutine aufrufen */
/*                               2. Abweichungsberechnung */

float vergleich ();

/*-----
                Vergleich
-----*/

float vergleich ()
{
    float quaabweichung;
    char dateiBerechnung[15][80],
        dateiExperiment[15][80],
        dateiNamenTemp[15][80],
        dateiSumme[15][80],
        dateiWerte[15][80],
        dateiSummeBulk[15][80],
        dateiBerechnungBulk[15][80];
    char *tab = ".tab",
        *dat = ".dat",
        *text = ".txt",
        *ptrHilf;
    int maxKompartimente,
        maxWerte,
        maxParameter,
        i,
        j,
        k=0,
        zahl,
        matrix[15][15],
        m,
        boolean = 0,
        anzahlSumme = 0;

    maxKompartimente = floor(s_parameter[0].startwert);
    maxWerte = maxKompartimente;
    maxParameter = floor(s_parameter[1].startwert);

/* Welche Kompartimente sollen als Summe ausgegeben werdn? */
for (i = 0; i <= maxKompartimente-2; i++)
{

```

```

    for (j = i+1; j <= maxKompartimente-1; j++)
    {
        if (floor(s_parameter[i*maxParameter+2].startwert) ==
floor(s_parameter[j*maxParameter+2].startwert))
        {
            matrix[i][i] = 1;
            matrix[i][j] = 1;
            matrix[j][j] = 1;
            strcpy (dateiNamenTemp[k], dateinamen[i]);
            dateiNamenTemp[k][3] = '\0';
            boolean = 1;
        }
        else
        {
            matrix[i][j] = 0;
        }
    }
    if (boolean == 1)
    {
        k++;
        boolean = 0;
        maxWerte --;
    }
}

anzahlSumme = k;

/* Summendateien */

for (i = 0; i <= anzahlSumme-1; i++)
{
    strcpy (dateiExperiment[i], dateiNamenTemp[i]);
    ptrHilf = strcat(dateiExperiment[i], tab);
    strcpy (dateiExperiment[i], ptrHilf);

    strcpy (dateiSumme[i], dateiNamenTemp[i]);
    ptrHilf = strcat(dateiSumme[i], text);
    strcpy (dateiSumme[i], ptrHilf);

    strcpy(dateiSummeBulk[i], dateiNamenTemp[i]);
    ptrHilf = strcat(dateiSummeBulk[i], dat);
    strcpy (dateiSummeBulk[i], ptrHilf);

    strcpy (dateiWerte[i], dateiSummeBulk[i]);
}

/* sonstige Kompartimente */

boolean = 0;
k = 0;
m = 0;

for (i = 0; i <= maxKompartimente-1; i++)
{
    boolean = 0;
    for (j = i; j <= maxKompartimente-1; j++)
    {
        if (matrix[i][j] == 1)
        {
            boolean = 1;
        }
    }
}

if (boolean != 1)
{
    strcpy (dateiExperiment[(anzahlSumme+m)], dateinamen[i]);
    ptrHilf = strcat(dateiExperiment[(anzahlSumme+m)], tab);
    strcpy (dateiExperiment[(anzahlSumme+m)], ptrHilf);
}

```



```

        strcpy (dateiWerte[(anzahlSumme+m)], dateinamen[i]);
        ptrHilf = strcat(dateiWerte[(anzahlSumme+m)], dat);
        strcpy (dateiWerte[(anzahlSumme+m)], ptrHilf);

        m ++;
    }
}

for (i = 0; i <= maxKompartimente-1; i++)
{
    strcpy (dateiBerechnung[i], dateinamen[i]);
    ptrHilf = strcat(dateiBerechnung[i], text);
    strcpy (dateiBerechnung[i], ptrHilf);

    strcpy (dateiBerechnungBulk[i], dateinamen[i]);
    ptrHilf = strcat(dateiBerechnungBulk[i], dat);
    strcpy (dateiBerechnungBulk[i], ptrHilf);
}

profil (dateiBerechnungBulk, dateiSummeBulk, anzahlSumme, matrix);

if (informationen.varMax != 0)
{
    quaabweichung = abweichung(dateiExperiment, dateiWerte, maxWerte);
}

return (quaabweichung);
}

```

INCLUDE optimier.c

```

void parameterBereitstellen (float k[]);

/* Aufbereitung der variablen Parameter der Steuerdatei */

void parameterBereitstellen (float k[])
{
    int i,
        j = 0;

    for (i = 0; i <= informationen.paraMax; i++)
    {
        if (i == informationen.varPosition[j])
        {
            s_parameter[i].startwert = k[j];
            j ++;
        }
    }
    return;
}

void optimierung ();

/* -----
           optimierung
    Unterprogramm zur Optimierung (Minimierung) eines Funktionswertes
    mit dem Simplex-Algorithmus
    -----
*/

void optimierung()
{
    FILE *fertig;
    char hilf[20];
    int i,
        j,

```

```

    ihi,
    inhi,
    ilo,
    s,
    m,
    mp,
    np,
    nmax,
    ndim,
    mpts,
    iter,
    itmax,
    intvar,
    zaehler = 0;

float  alpha,
      betao,
      gamma,
      ftol,
      rtol,
      zwi3,
      quadrat,
      ypr,
      yprp,
      matrix[16][15],
      yps[15],
      pr[15],
      pbar[15],
      prr[15],
      pbarz[15],
      k[15];

ndim = informationen.varMax - 1;
mpts = ndim + 1;
np=ndim;
mp=np+1;

iter = 0;
itmax = 100;
alpha =1.0;
betao =0.5;
gamma =2.0;

quadrat = 0.0;
j = 0;

for (m = 0; m <= informationen.paraMax - 1; m++)
{
    if (s_parameter[m].boolean)
    {
        zaehler = j;
        for (i = 0; i <= mp; i++)
        {
            zaehler = zaehler ++;
            if (zaehler > (informationen.varMax + 1)) zaehler = 1;
            matrix[i][j] = zaehler/(informationen.varMax + 2.0);
            matrix[i][j] = matrix[i][j] * (s_parameter[m].obererWert-s_parameter[m].untererWert);
            matrix[i][j] = matrix[i][j] + s_parameter[m].untererWert;
        }
        j++;
    }
}

for (i=0; i<= mp; i++)
{
    for (j=0; j<= np; j++)
    {
        k[j] = matrix[i][j];
    }
    parameterBereitstellen (k);
}

```

```

    quadrat = vergleich ();
    printf ("Abweichung = %12.2f\t", quadrat);
    yps[i] = quadrat;
}

Sprung1: ilo = 0;

alpha = 1;
betao = 0.9;
gamma = 1.1;

if (yps[0] > yps[1])
{
    ihi = 0;
    inhi = 1;
}
else
{
    ihi = 1;
    inhi = 0;
}

for (i= 0; i<= mpts; i++)
{
    if (yps[i] < yps[ilo])
    {
        ilo = i;
    }
    if (yps[i] > yps[ihi])
    {
        inhi = ihi;
        ihi = i;
    }
    else
    {
        if (yps[i] > yps[inhi])
        {
            if (i != ihi)
            {
                inhi = i;
            }
        }
    }
}

/*
    rtol = 2 * ABS(yps[ihi] - yps[ilo]) / (ABS(yps[ihi]) + ABS(yps[ilo]));
    IF rtol < ftol THEN GOTO Sprung100;
*/

if (iter == itmax)
{
    printf ("Zuviele Iterationen \n");
    goto Sprung100;
}

iter = iter + 1;

for (j = 0; j <= ndim; j++) pbar[j] = 0;

for (i = 0; i <= mpts; i++)
{
    if (i != ihi)
    {
        for (j = 0; j<= ndim; j++)
        {
            pbar[j] = pbar[j] + log(matrix[i][j]);
        }
    }
}

```

```

for (j = 0; j <= ndim; j++)
{
    pbarz[j] = pbar[j] / ndim;
    pr[j] = (1 + alpha) * pbarz[j] - alpha * log(matrix[ihi][j]);
    k[j] = exp(pr[j]);
}

parameterBereitstellen (k);
quadrat = vergleich ();
printf ("Abweichung = %12.2f\t", quadrat);
ypr = quadrat;

if (ypr <= yps[ihi])
{
    /* Vergrößerung */
    for (j = 0; j <= ndim; j++)
    {
        prr[j] = gamma * pr[j] + (1 - gamma) * pbarz[j];
        k[j] = exp(prr[j]);
    }
    printf ("Vergrößern \n");

    parameterBereitstellen (k);
    quadrat = vergleich ();
    printf ("Abweichung = %12.2f\t", quadrat);
    ypr = quadrat;

    if (ypr < yps[ihi])
    {
        printf ("Vergrößerung ist besser als das Minimum \n");
        for (j = 0; j <= ndim; j++)
        {
            matrix[ihi][j] = exp(prr[j]);
        }
        yps[ihi] = ypr;
    }
    else
    {
        printf ("Vergrößerung ist schlechter als das Minimum \n");
        for (j = 0; j <= ndim; j++)
        {
            matrix[ihi][j] = exp(pr[j]);
        }
        yps[ihi] = ypr;
    }
}
else
{
    if (ypr >= yps[ihi])
    {
        if (ypr < yps[ihi])
        {
            printf ("Neuer Wert ist der zweitschlechteste \n");
            for (j = 0; j <= ndim; j++)
            {
                matrix[ihi][j] = exp(pr[j]);
            }
            yps[ihi] = ypr;
        }
    }

    for (j = 0; j <= ndim; j++)
    {
        betao = 0.5 * alpha;
        prr[j] = betao * log(matrix[ihi][j]) + (1 - betao) * pbarz[j];
        k[j] = exp(prr[j]);
    }

    printf ("Verkleinern, da der neue Wert am schlechtesten ist \n");
}

```

```

parameterBereitstellen (k);
quadrat = vergleich ();
printf ("Abweichung = %12.2f\t", quadrat);
yprr = quadrat;

if (yprr < yps[ihi])
{
    printf ("Verkleinerung war von Vorteil \n");
    for (j = 0; j <= ndim; j++)
    {
        matrix[ihi][j] = exp(pr[j]);
    }
    yps[ihi] = yprr;
}
else
{
    printf ("Sonderweg \n");
    for (i = 0; i <= mpts; i++)
    {
        if (i != ilo)
        {
            for (j = 0; j <= ndim; j++)
            {
                pr[j] = 0.5 * (log(matrix[i][j]) + log(matrix[ilo][j]));
                matrix[i][j] = exp(pr[j]);
                k[j] = exp(pr[j]);
            }

            parameterBereitstellen (k);
            quadrat = vergleich ();
            printf ("Abweichung = %12.2f\t", quadrat);
            yps[i] = quadrat;
        }
    }
}
else
{
    for (j = 0; j <= ndim; j++)
    {
        matrix[ihi][j] = exp(pr[j]);
    }
    yps[ihi] = ypr;
    printf ("Mittelfeld \n");
}
}

printf ("Iteration: %d\t Quadrat: %f\n", iter, quadrat);
goto Sprungl;
Sprungl00: printf ("Ende \n");

fertig = fopen ("fertig.dat", "wt");

for (i = 1; i <= ndim; i++)
{
    k[i] = matrix[ilo][i];
    fprintf (fertig,"%2.5e\t", k[i]);
}
parameterBereitstellen (k);
quadrat = vergleich ();
printf ("Abweichung = %12.2f\t", quadrat);
fprintf(fertig, "geringste Abweichung %2.4e\n Iteration %d", yps[ilo], iter);

fclose(fertig);

return;
}

```

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bettin
Vorname	Andreas
Geburtsdatum	16.3.1967
Geburtsort	Minden/Westfalen
Familienstand	verheiratet, drei Kinder

Schulbildung

1973-1977	Grundschule Hafenschule in Minden/Westfalen
1977-1986	Caroline-von-Humboldt-Gymnasium in Minden/Westfalen

Zivildienst

1986-1988	Diakonisches Werk
-----------	-------------------

Studium

1988-1994	Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig
1990	Vordiplom
1994	Diplom

Berufstätigkeit

1994-1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technologie und Biosystemtechnik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
Seit 1998	Mitarbeiter der SAP AG in Walldorf/Baden